

ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 19 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 1988	ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΟΥ 753

ΥΠΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ & ΕΓΚΡΙΣΕΙΣ

Αριθ. 1228/88

Συμπλήρωση του Π.Δ. 329/83 περί ταξινόμησης, συσκευασίας και επισήμανσης των επικινδύνων ουσιών» σε συμμόρφωση με την οδηγία 88/302/ΕΟΚ για την ενάτη προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΚΡΑΤΟΥΣ
ΑΝΩΤΑΤΟ ΧΗΜΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
(Συνεδρίαση 5.7.88)

Έχοντας υπόψη:

1. Το έγγραφο του Γενικού Χημείου του Κράτους, 603/88.
2. Τις διατάξεις του άρθρου 1 παρ. 1 και 3 του Ν. 1338/1983 «εφαρμογή του κοινοτικού δικαίου» (ΦΕΚ 34/τ. Α'/17.3.1983) όπως τροποποιήθηκε με το Ν. 1440/1984 «συμμετοχή της Ελλάδος στο Κεφάλαιο, στα αποθεματικά και στις προβλέψεις της Ευρωπαϊκής Τράπεζας Επενδύσεων, στο Κεφάλαιο της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Άνθρακος και Χάλυβος και του Οργανισμού Εφοδιασμού ΕΥΡΑΤΟΜ» (ΦΕΚ 70/τ. Α'/21.5.1984).
3. Το εδάφιο δ της παρ. 8 του άρθρου 6 του Νόμου 4328/1929 «περί συστάσεως του Γενικού Χημείου του Κράτους», όπως τροποποιήθηκε και συμπληρώθηκε με τον ΑΝ 754/1937 (αρ. 3 παρ. 2 και 3), ΦΕΚ 247/ΤΑ/1937.
4. Το άρθρο 4 του Διατάγματος της 31ης Οκτωβρίου 1929 «περί κανονισμού της λειτουργίας και των εργασιών του Ανωτάτου Χημικού Συμβουλίου» (ΦΕΚ 391/ΤΑ/31.10.1929).
5. Το Νόμο 115/1975 «περί τροποποιήσεως διατάξεων τινων του Ν. 4328/1929» (ΦΕΚ 172/ΤΑ/20.8.1975).
6. Την απόφαση των Υπουργών Προεδρίας και Οικονομικών για αναμόρφωση συλλογικών οργάνων Γνωμοδοτικής και Αποφασιστικής αρμοδιότητας του Υπουργείου Οικονομικών αρ. 0.208/181, ΦΕΚ 214/ΤΒ/82.
7. Την Α 9911/ΔΙΟΝΟΣΕ 1737/3.12.87 κοινή απόφαση του Πρωθυπουργού και του Υπουργού Εθνικής Οικονομίας «Ανάθεση αρμοδιοτήτων στους Υφυπουργούς Εθνικής Οικονομίας» (ΦΕΚ 702/ΤΒ/87), αποφασίζουμε:

Εγκρίνουμε τη συμπλήρωση του παραρτήματος V του Π.Δ. 329/83 με το οποίο έγινε εναρμόνιση της Εθνικής μας Νομοθεσίας με την οδηγία του Συμβουλίου 67/548/ΕΟΚ ως εξής:

Άρθρο 1

Σκοπός της παρούσης απόφασης είναι η εναρμόνιση της Ελληνικής Νομοθεσίας προς την οδηγία της Επιτροπής 88/302/ΕΟΚ (Ε.Ε. L 133/30.5.88 σελ. 1). Η παραπάνω οδηγία είναι η ένατη για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας του Συμβουλίου 67/548/ΕΟΚ (όπως αυτή τροποποιήθηκε για έκτη φορά με την οδηγία 79/831 ΕΟΚ) προς την οποία η Ελληνική Νομοθεσία έχει εναρμονισθεί με το Π.Δ. 329/83 (ΦΕΚ 118/Α/83) και τις αποφάσεις του Α.Χ.Σ. αρ. 279/85 (ΦΕΚ 146/Β/85) 1232/87 (ΦΕΚ 501/Β/87) και 2459/87 (ΦΕΚ 77/Β/88), με τις οποίες τροποποιείται και συμπληρώνεται το παραπάνω Π.Δ.

Άρθρο 2

Το παράρτημα V του Π.Δ. 329/83 συμπληρώνεται ως εξής: Οι μέθοδοι δοκιμασίας που περιγράφονται παρακάτω αφορούν τον προσδιορισμό ορισμένων τοξικολογικών και οικοτοξικολογικών ιδιοτήτων που περιλαμβάνονται στο παράρτημα VIII της οδηγίας 79/831 ΕΟΚ του Συμβουλίου. Περιγράφονται μέθοδοι δοκιμασίας που υπάγονται στο επίπεδο 1 και επίπεδο 2 του παραρτήματος VIII, αλλά οι δοκιμασίες δεν υποδιαιρούνται βάσει των διαφόρων επιπέδων.

Ο Πρόεδρος — Ο Γραμματέας
Στ. Χατζηγιανναχός — Χαρ. Χαμαλίδης

Τα Μέλη:
ΕΥΑΓ. ΤΣΙΓΑΡΙΔΑΣ, ΑΝΤ. ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ
ΕΥΑΓ. ΣΥΜΒΩΝΗΣ, ΔΙΟΝ. ΦΡΑΓΚΑΤΟΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ Β: ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΜΕΡΟΣ Β

ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Υποχρόνιες-χρόνιες μελέτες και μελέτες καρκινογενετικότητας

Χαρακτηρισμός της δοκιμαζόμενης ουσίας και του μείγματος αγωγής

Η σύνθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων και οι σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητές της, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας, πρέπει να είναι γνωστές πριν την έναρξη οποιασδήποτε μελέτης τοξικότητας.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή της οδού χορήγησης, τη σχεδίαση υποχρόνιων και χρόνιων μελετών ή μελετών καρκινογενετικότητας και τη διαχείριση και φύλαξη της δοκιμαζόμενης ουσίας.

Οι πληροφορίες για τη χημική δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες μπορούν επίσης να παράσχουν μια ένδειξη των χαρακτηριστικών απορρόφησης από την οδό χορήγησης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, καθώς επίσης και των δυνατοτήτων μεταβολικής και ιστολογικής κατανομής. Μπορούν επίσης να υπάρξουν πληροφορίες για τοξικοκινητικές παραμέτρους από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας και τοξικοκινητικότητας.

Η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της δοκιμαζόμενης ουσίας (συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων, εάν είναι δυνατόν) στο μέσο χορήγησης των δόσεων, καθώς επίσης και στο βιολογικό υλικό, θα πρέπει να προηγείται από την έναρξη της μελέτης.

Πειραματόζωα: επιλογή του είδους και της ποικιλίας

Επειδή είναι ανάγκη να επιβάλλεται αγωγή στα ζώα για το μεγαλύτερο μέρος της διάρκειας της ζωής τους, οι μελέτες τείνουν να περιορισθούν στη χρήση ευκολοσυντήρητων και σχετικά βραχύβιων πειραματικών ειδών ζώων. Είναι εξαιρετικά επιθυμητό να είναι γνωστή η εμφάνιση αυτογενών ασθενειών και όγκων στο στέλεχος του χρησιμοποιούμενου ζώου, όταν διατηρείται κάτω από παρόμοιες συνθήκες.

Οι ποικιλίες των ζώων πρέπει να χαρακτηρίζονται με σαφήνεια και να μην παρουσιάζουν συγγενή ελαττώματα. Η χρήση ποικιλιών ζώων που προήλθαν από αιμομεικτική αναπαραγωγή ή από F.1 υβρίδια παρουσιάζει μερικά πλεονεκτήματα από της απόψεως αυτής, αλλά, στην περίπτωση που διατίθενται επαρκή στοιχεία ιστορικού για ποικιλίες που προήλθαν από αναπαραγωγή μη αιμομεικτικών στελεχών ζώων, με τη χρήση ζώων που προήλθαν από περιορισμένο αρχικό αριθμό ζώων, τα ζώα αυτά είναι αποδεκτά.

Φροντίδα για τα ζώα, δίαιτα και χορήγηση νερού

Τα πειράματα και οι μελέτες με τα ζώα θα διεξάγονται σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ανθρωπιστικές αρχές και οι διεθνείς εξελίξεις στον τομέα της πρόνοιας για τα ζώα.

Ο αυστηρός έλεγχος των συνθηκών του περιβάλλοντος και των κατάλληλων τεχνικών μεθόδων για τη φροντίδα των ζώων είναι επιτακτικός για να υπάρξουν ουσιαστικά αποτελέσματα. Παράγοντες όπως είναι οι συνθήκες κατοικίας, οι παρεμπίπτουσες νόσοι, η φαρμακοθεραπεία, οι προσμείξεις στη δίαιτα, στον αέρα, στο νερό και οι ευκολίες στρωμνής και γενικής ζωικής φροντίδας μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα των μελετών με τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων. Γενικά, πρέπει να είναι γνωστό το αποτέλεσμα των χημικών αποστειρωτικών πάνω στη μελέτη.

Η δίαιτα πρέπει να ικανοποιεί όλες τις απαιτήσεις διατροφής του χρησιμοποιούμενου είδους και να μην περιέχει προσμείξεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα του πειράματος. Τα τρωκτικά πρέπει να λαμβάνουν τροφή και νερό κατά βούληση και η τροφή τους να αντικαθίσταται τουλάχιστον κάθε εβδομάδα. Σήμερα χρησιμοποιούνται τρεις τύποι δίαιτας, η συμβατική, η συνθετική και διάφορες δίαιτες μη καθορισμένης μορφής.

Οποιαδήποτε δίαιτα και αν επιλεγεί, οι προμηθευτές πρέπει να εξακριβώνουν με περιοδικό έλεγχο τη θρεπτική αξία και το επίπεδο των ρυπαντικών ουσιών στη βασική δίαιτα και να παρέχουν τις πληροφορίες αυτές στο εργαστήριο για κάθε παρτίδα τροφών. Είναι επίσης εξαιρετικά επιθυμητό να είναι γνωστές οι επιδράσεις της διαιτητικής αγωγής πάνω στο μεταβολισμό καθώς επίσης και στην ανάπτυξη όγκων και στη μακροβιότητα των ζώων.

Εκτός αυτών, μπορούν να διενεργηθούν δοκιμαστικές αναλύσεις της βασικής δίαιτας από το εργαστήριο δοκιμασιών τόσο για τα συστατικά των τροφών όσο και για τις τυχαίες ρυπαντικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινογόνων ουσιών. Εάν γίνει αυτό, τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να διατηρηθούν και να συμπεριληφθούν στην τελική έκθεση που θα συνταχθεί για κάθε δοκιμαζόμενη ουσία.

Κοινά διαιτητικά συστατικά που είναι γνωστό ότι επιδρούν στην καρκινογένεση (π.χ. αντιοξειδωτικά, μη κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, σελήνιο), δεν πρέπει να υπάρχουν σε ενοχλητικές συγκεντρώσεις. Η ενδεχόμενη επίδραση διαφόρων κοινών διαιτητικών ρυπαντικών ουσιών στην εκτίμηση της καρκινογενετικότητας απαιτεί να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην ύπαρξη καταλοίπων εντομοκτόνων, οργανοχλωριωμένων ενώσεων, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, οιστρογόνων, βαρέων μετάλλων, νιτροζαμινών και μυκοτοξινών μέσα στη δίαιτα.

Στην περίπτωση που η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο νερό ή στην τροφή, χρήσιμες είναι οι δοκιμασίες σταθερότητας. Για να καθορισθεί η απαιτούμενη συχνότητα προπαρασκευής της δίαιτας και παρακολούθησης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν δοκιμασίες σταθερότητας και ομοιογένειας που έχουν κατάλληλα εκτελεσθεί πριν από τις μελέτες επαναλαμβανόμενων δόσεων.

Όταν οι τροφές είναι αποστειρωμένες, πρέπει να είναι γνωστές οι επιδράσεις των διαδικασιών αυτών στη δοκιμαζόμενη ουσία και στα διαιτητικά συστατικά. Πρέπει να γίνουν οποιεσδήποτε κατάλληλες προσαρμογές.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καρκινογένεσης, οι ερευνητές πρέπει να είναι ενήμεροι για την ύπαρξη ενδεχόμενα επιμολυντικών ουσιών στο χρησιμοποιούμενο νερό. Το νερό που είναι εγκεκριμένο για ανθρώπινη κατανάλωση είναι γενικά ικανοποιητικό, και πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τη σύστασή του.

Η συγκέντρωση μιας δοκιμαζόμενης ουσίας μέσα στη δίαιτα μπορεί να χρειάζεται προσαρμογή ανάλογα με την ανάπτυξη των ζώων, έτσι ώστε να διατηρείται μια λογικά σταθερή λήψη ουσίας σε σχέση με το βάρος του σώματος.

Η θρεπτική αξία της δίαιτας μάρτυρος και της δίαιτας πειράματος πρέπει να καταστεί όσο το δυνατόν πιο όμοια. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να εξεταστεί η θρεπτική αξία της δοκιμαζόμενης ουσίας που έχει αναμειχθεί μέσα στη δίαιτα. Η πείρα διδάσκει ότι ένα ποσοστό των μη θρεπτικών δοκιμαζόμενων ουσιών μέσα στη δίαιτα, που ανέρχεται μέχρι και στο 5% της ποσότητάς τους, είναι απίθανο να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό τη θρεπτική αξία της δίαιτας.

1. Μελέτες τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται με εισπνοή

Δεν προσδιορίζεται κανένα οριακό πείραμα, γιατί δεν έγινε δυνατό να ορισθεί μία και μόνο οριακή τιμή έκθεσης εισπνοής.

2. Μελέτη τερατογενετικότητας

Η μέθοδος του πειράματος κατευθύνεται αρχικά στη χορήγηση της ουσίας μέσω του στόματος. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί χορήγησης ανάλογα με τις φυσικές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας ή της πιθανής οδού της ανθρώπινης έκθεσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η μέθοδος του πειράματος πρέπει να προσαρμοσθεί κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη τα πρόσφυή στοιχεία των δοκιμασιών πειραμάτων 28 ημερών.

3. Τοξικοκινητική

Οι τοξικοκινητικές μελέτες βοηθούν στην ερμηνεία και αξιολόγηση των δεδομένων τοξικότητας. Οι μελέτες αυτές αποβλέπουν στο να διευκρινήσουν ιδιαίτερες απόψεις της τοξικότητας της υπό δοκιμασία χημικής ουσίας, τα δε αποτελέσματά τους μπορούν να βοηθήσουν στο σχεδιασμό των περαιτέρω μελετών τοξικότητας. Δεν χρειάζεται να προσδιορίζονται όλες οι παράμετροι σε κάθε περίπτωση. Μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις είναι απαραίτητη όλη η σειρά των τοξικοκινητικών μελετών (απορρόφηση, έκκριση, κατανομή και μεταβολισμός). Για ορισμένες ενώσεις ενδείκνυνται αλλαγές στη σειρά αυτή ή μπορεί να είναι αρκετή και μελέτη με μια μόνο δόση.

Ορισμοί

Τοξικοκινητικότητα:	η μελέτη της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και έκκρισης των ουσιών του πειράματος.
Απορρόφηση:	η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η χορηγούμενη ουσία εισέρχεται στο σώμα.
Έκκριση:	η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η χορηγούμενη ουσία ή/και τα προϊόντα του μεταβολισμού της αποβάλλονται από το σώμα.
Κατανομή:	η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η απορροφηθείσα ουσία ή/και τα προϊόντα του μεταβολισμού της κατανέμονται στο σώμα.
Μεταβολισμός:	η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η δομή της χορηγούμενης ουσίας μεταβάλλεται μέσα στο σώμα με ενζυματικές ή μη ενζυματικές αντιδράσεις.

4. Οξεία και υποξεία μελέτη σε δεύτερο είδος

Ο σκοπός μιας μελέτης σε δεύτερο είδος είναι να συμπληρώσει τα συμπεράσματα που βγήκαν από το πρώτο.

Σε περίπτωση μελέτης σε δεύτερο είδος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ή να προσαρμοσθεί για μικρότερο αριθμό ζώων η μέθοδος δοκιμασίας που έχει ήδη περιγραφεί.

5. Μελέτες γονιμότητας

Όταν απαιτείται δοκιμασία για αναπαραγωγή επί τρεις γενεές, η περιγραφείσα μέθοδος για την αναπαραγωγή επί δύο γενεές μπορεί να επεκταθεί ώστε να καλύψει την τρίτη γενεά.

6. Μελέτες μεταλλαξιογένεσης

Πρόσθετα πειράματα μεταλλαξιογένεσης που περιλαμβάνουν πειράματα «SCREENING» για καρκινογένεση

Στο παράρτημα VIII της οδηγίας αναφέρονται πρόσθετες μελέτες για την περαιτέρω έρευνα της μεταλλαξιογένεσης ή την προληπτική εξέταση για καρκινογένεση. Οι μελέτες που περιγράφονται στο τμήμα αυτό μπορούν γενικά να χρησιμοποιηθούν για την έρευνα και στους δύο αυτούς τομείς.

Εισαγωγή

Η αρχική εκτίμηση της μεταλλαξιογενούς δραστηριότητας μιας ουσίας συνίσταται σε δοκιμασίες για (εστιακές) μεταλλάξεις γονιδίων σε βακτήρια και για κυτταρογενετική βλάβη σε κύτταρα θηλαστικών (in vitro ή in vivo). Κατάλληλοι μέθοδοι για τις βασικές αυτές μελέτες περιγράφηκαν προηγουμένως. Το τμήμα αυτό ασχολείται με συμπληρωματικές μελέτες οι οποίες είναι κατάλληλες για την επαλήθευση ή/και επέκταση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στις βασικές μελέτες και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ορισμένους σκοπούς όπως είναι:

1. η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από της βασικές μελέτες·
2. η έρευνα των τελικών σημείων που δεν μελετώνται στη βασική μελέτη·
3. η προώθηση ή η επέκταση μελετών in vivo.

Για τους σκοπούς αυτούς η σειρά των δοκιμασιών που περιγράφονται περιλαμβάνουν, τόσο in vitro όσο και in vivo, ευκαρυωτικά συστήματα και μια εκτεταμένη σειρά βιολογικών τελικών σημείων. Οι δοκιμασίες παρέχουν πληροφορίες για εστιακές μεταλλάξεις σε οργανισμούς περισσότερο σύνθετους απ' ό,τι τα χρησιμοποιούμενα βακτηρίδια στη βασική μελέτη και επεκτείνουν τις πληροφορίες στην ικανότητα μιας ουσίας να προκαλέσει χρωμοσωμική απόκλιση.

Περιγράφονται επίσης δοκιμασίες για τελικά σημεία διαφορετικά από τις εστιακές μεταλλάξεις και τη χρωμοσωμική απόκλιση. Οι δοκιμασίες αυτές παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμαστικά προγράμματα.

Σαν γενική αρχή, κατά την εξέταση ενός προγράμματος περαιτέρω μελετών μεταλλαξιογένεσης, η σχεδίαση θα πρέπει να γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχει σχετικές πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το μεταλλαξιογενετικό ή/και καρκινογενετικό δυναμικό της εν λόγω ουσίας.

Οι πραγματικές μελέτες που μπορεί να είναι κατάλληλες σε μια ιδιαίτερη περίπτωση, θα εξαρτηθούν από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των χημικών και των φυσικών χαρακτηριστικών της ουσίας, των αποτελεσμάτων των αρχικών βακτηριολογικών και κυτταρογενετικών δοκιμασιών, του μεταβολικού χαρακτήρα της ουσίας, των αποτελεσμάτων άλλων τοξικολογικών μελετών και των γνωστών χρήσεων της ουσίας. Ένα αυστηρό πρόγραμμα επιλογής δοκιμασιών είναι ως εκ τούτου ακατάλληλο εν όψει της ποικιλίας των παραγόντων οι οποίοι πιθανόν να απαιτούν εξέταση. Ωστόσο, μερικές γενικές αρχές μπορούν να είναι χρήσιμες. Εάν μια δοκιμασία ήταν θετική στις βασικές μελέτες, οι συμπληρωματικές μελέτες μπορούν να περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία δοκιμασία η οποία να μπορεί να ανιχνεύει το ίδιο γενετικό τελικό σημείο. Εάν και οι δύο δοκιμασίες στις βασικές μελέτες ήταν αρνητικές, θα πρέπει κανονικά να εκτελεσθούν δοκιμασία για τις μεταλλάξεις γονιδίων καθώς και δοκιμασία για χρωμοσωμικές αποκλίσεις, υπό τη μορφή συμπληρωματικών μελετών. Ίσως επίσης να είναι κατάλληλη η απόκτηση πρόσθετων στοιχείων από ενδεικτικές δοκιμασίες (που περιγράφονται κατωτέρω). Οι μέθοδοι για τέτοιες έρευνες ταξινομούνται κατωτέρω με βάση το κύριο γενετικό τελικό τους σημείο.

Μελέτες για την έρευνα (εστιακών) μεταλλάξεων γονιδίων

Για την περαιτέρω έρευνα της δυνατότητας μιας ουσίας να παράγει (εστιακές) μεταλλάξεις γονιδίων, μία από τις παρακάτω δοκιμασίες μπορεί να είναι κατάλληλη:

α) μελέτες πρόσω ή αντίστροφης μετάλλαξης με τη χρήση ευκαρυωτικών μικροοργανισμών [σακχαρομύκης μπίρας (Saccharomyces cerevisiae)]·

β) μελέτες in vitro για την έρευνα της πρόσω μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών·

γ) δοκιμασία θανατηφόρου φυλοσυνδέτου υπολειπομένου χαρακτήρος σε Drosophilia melanogaster·

δ) δοκιμασία σωματικής κυτταρικής μετάλλαξης in vivo: δοκιμασία κηλίδας σε ποντικό.

Μελέτες για την έρευνα χρωμοσωμικών αποκλίσεων

Όταν υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα της δυνατότητας μιας ουσίας να παράγει χρωμοσωμικές αποκλίσεις, μία από τις παρακάτω δοκιμασίες μπορεί να είναι κατάλληλη:

α) κυτταρογενετικές μελέτες in vivo σε θηλαστικά.

Η μεταφασική ανάλυση in vivo κυττάρων μυελού οστών θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη εάν δεν περιλήφθηκε στην αρχική εκτίμηση (βασικές μελέτες). Εκτός αυτού, μπορεί να γίνει έρευνα in vivo στην κυτταρογενετική των γαμετογόνων κυττάρων·

β) κυτταρογενετικές μελέτες in vitro σε κύτταρα θηλαστικών, εάν δεν περιλήφθηκαν στην αρχική εκτίμηση·

γ) δοκιμασία θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος σε τρωκτικά·

δ) δοκιμασία κληρονομήσιμης μετατόπισης (γονιδίων) ποντικών.

Ενδεικτικές δοκιμασίες για την επίδραση στο DNA

Υπάρχουν μέθοδοι οι οποίες παρέχουν μια ένδειξη ορισμένων επιδράσεων πάνω στο DNA, αλλά δεν έχουν μεταλλαξιγενές αποτέλεσμα, όπως το «τελικό σημείο». Οι μελέτες αυτές μπορούν να παρέχουν πληροφορίες οι οποίες συμπληρώνουν εκείνες που λαμβάνονται από μελέτες μεταλλαξιγένεσης και οι οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες στην ερμηνεία των εν λόγω μελετών. Όταν υπάρχει ανάγκη για τη διενέργεια των ερευνών αυτών, μπορεί να είναι κατάλληλη μία από τις παρακάτω μεθόδους με τη χρήση ευκαρυωτικών μικροοργανισμών ή κυττάρων θηλαστικών:

α) μιτωτικός ανασυνδυασμός σε σακχαρομύκητα της μπίρας (Saccharomyces cerevisiae)·

β) βλάβη και επανόρθωση DNA —απρογραμμάτιστη σύνθεση DNA— σε κύτταρα θηλαστικών (in vitro)·

γ) ανταλλαγή αδελφών χρωματιδίων σε κύτταρα θηλαστικών (in vitro).

Άλλες ενδεικτικές δοκιμασίες για δυνητική καρκινόγενεση

Υπάρχουν δοκιμές μετασχηματισμού κυττάρων θηλαστικών οι οποίες μετράνε την ικανότητα μιας ουσίας να προκαλεί μορφολογικές μεταβολές και μεταβολές ως προς τη συμπεριφορά σε καλλιέργεια κυττάρων, οι οποίες πιστεύεται ότι συνδέονται με κακοήθη μετασχηματισμό in vivo. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αριθμός διαφορετικών κυτταρικών τύπων και κριτηρίων μετασχηματισμού.

Εκτίμηση του κινδύνου για κληρονομήσιμες επιδράσεις σε θηλαστικά

Υπάρχουν μέθοδοι για τη μέτρηση των κληρονομήσιμων επιδράσεων σε ολόκληρα θηλαστικά, που παρήχθησαν από (εστιακές) μεταλλάξεις γονιδίων, όπως είναι η ειδική δοκιμασία θέσης επί χρωματιδίου ποντικού [1], ή για χρωμοσωμικές αποκλίσεις, όπως είναι το πείραμα κληρονομήσιμης μετατόπισης γονιδίων ποντικού. Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την εκτίμηση του πιθανού κίνδυνου μιας ουσίας για τον άνθρωπο. Ωστόσο, εν όψει του περίπλοκου χαρακτήρα την δοκιμασιών αυτών και του πολύ μεγάλου αριθμού ζώων που χρειάζονται, ιδιαίτερα για τη δοκιμασία ειδικής θέσης, απαιτείται τεκμηριωμένη αιτιολόγηση πριν την ανάληψη των μελετών αυτών.

(1) Η ειδική δοκιμασία θέσης επί χρωματιδίου ποντικού (η οποία δεν περιγράφεται στο έγγραφο αυτό) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της μετάλλαξης των γαμετογόνων κυττάρων στην πρώτη γενεά μετά την έκθεση σε μία μεταλλαξιγόνο ουσία. Γενετικές μεταβολές που οδηγούν σε αλλαγές στα προϊόντα γονιδίων με ορατά φαινότυπα, μπορούν να ανιχνευθούν και να προσδιορισθεί η ποσότητά τους.

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

ΜΕΛΕΤΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται καθημερινά από το στόμα σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών. Κατά την περίοδο της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος της δοκιμασίας, υφίστανται νεκροψία.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά πειραματόζωα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες.

Η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να χορηγείται μέσα στη δίαιτα, με καθετήρα στομάχου, με κάψουλες ή μέσα στο πόσιμο νερό. Οι δόσεις για όλα τα ζώα πρέπει να χορηγούνται με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου δοκιμασίας. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα προσθετικά για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, θα πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Εάν χρειασθεί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά στοιχεία.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Εφόσον δέν υπάρχουν αντενδείξεις, το προτιμώμενο είδος είναι ο αρουραίος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστήρια και η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει κατά προτίμηση πριν οι αρουραίοι φθάσουν σε ηλικία έξι έως οκτώ εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επίπεδο δόσης. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο δόσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για μεταγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και μία δόση μάρτυρος. Εξαιρουμένης της αγωγής με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει να έχουν κατά τα άλλα την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας της δοκιμασίας. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να διευκολύνει τη χορήγηση των δόσεων, οι μάρτυρες πρέπει να λαμβάνουν δόσεις με το έκδοχο κατά τον ίδιο τρόπο όπως οι ομάδες που υφίστανται την αγωγή, και να λαμβάνουν την ίδια ποσότητα εκδόχου με αυτή που λαμβάνεται από την ομάδα του υψηλότερου επίπεδου δόσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους, ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί οποιοδήποτε ίχνος τοξικότητας. Στην περίπτωση που υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο πρέπει να την υπερβεί. Η ιδανική περίπτωση είναι το μέσο επίπεδο δόσης να προκαλεί ελάχιστες παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τα επίπεδα δόσεων πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στις χαμηλές και στις ενδιάμεσες ομάδες, καθώς και στις ομάδες μάρτυρες, η επέλευση οποιωνδήποτε θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στη δίαιτα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μια σταθερή διαιτητική συγκέντρωση (ppm ή mg/kg τροφής) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης ανάλογα με το βάρος του σώματος των ζώων. Πρέπει να προσδιορισθεί η εναλλακτική μέθοδος που χρησιμοποιείται. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα στομάχου, η δόση πρέπει να χορηγείται σε παραπλήσιες χρονικές στιγμές κάθε ημέρα. Τα επίπεδα δόσης πρέπει να ρυθμίζονται κατά διαστήματα (εβδομαδιαία ή δισεβδομαδιαία) έτσι ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσης ανάλογα με το βάρος του σώματος του ζώου.

Οριακή δοκιμασία

Εάν μια μελέτη 90 ημερών, που διεξάγεται σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται με λεπτομέρεια παρακάτω, με επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, ή με υψηλότερο επίπεδο δόσης αναφορικά με ενδεχόμενη ανθρώπινη έκθεση, όπου αυτό είναι γνωστό, δεν παρέχει ενδείξεις τοξικών επιδράσεων, η συνέχιση του πειράματος μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαία. Για ουσίες χαμηλής τοξικότητας είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα ώστε οι ποσότητες και άλλες ιδιότητες της υπόψη δοκιμαζόμενης ουσίας, όταν χορηγούνται μέσα στη δίαιτα, να μην επηρεάζουν τις κανονικές απαιτήσεις διατροφής.

Περίοδος παρατήρησης

Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους. Πρέπει επίσης να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

Διαδικασία

Το ιδανικό είναι να λαμβάνουν τα ζώα δόσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας επτά ημέρες την εβδομάδα για μια περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματισθεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων.

Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (καθώς επίσης και για την κατανάλωση νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό), καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απωλείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της μελέτης όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα·

β) αιματολογική εξέταση, που συμπεριλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης, ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας·

γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές της δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και του νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων δοκιμασιών θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο δράσεως της ουσίας. Προτείνονται

προσδιορισμοί του ασβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος του ορού (1), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξεικού οξέως του ορού (2), της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκώματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μια επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δράσης της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων·

δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσεως αλλά μόνον όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που θα περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο έγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί, η τραχεία και οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, (οι σιελογόνοι αδένες), το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα (τα βοηθητικά γεννητικά όργανα), (το δέρμα), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας, (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο, το στέρνο με μυελό των οστών, (οι οφθαλμοί), (το μηριαίον οστούν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), (ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός) και (οι εξώφθαλμοι δακρυϊκοί αδένες). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνο εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στα όργανα και στους ιστούς των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρα και υψηλής δόσης.

β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.

γ) Τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσεων πρέπει να εξετασθούν.

δ) Οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποβληθούν σε ιστοπαθολογική εξέταση για τη διαπίστωση λοίμωξης, γιατί μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη η ιστοπαθολογική εξέταση του ήπατος και των νεφρών στις ομάδες αυτές. Μπορεί συνήθως να μην απαιτείται πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση των ζώων των ομάδων αυτών αλλά θα πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.

ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση θα πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις στις ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,

— συνθήκες δοκιμασίας,

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,

(1) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.
(2) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

— επίπεδο στο οποίο δεν προκαλείται καμία επίδραση, εφόσον είναι δυνατόν,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται καθημερινά από το στόμα σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματοζώων (μη τρωκτικών), (μία δόση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών). Κατά την περίοδο της χορηγήσεως της ουσίας τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος της δοκιμασίας, υφίστανται νεκροψία.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες.

Η δοκιμαζόμενη ουσία μπορεί να χορηγείται μέσα στη δίαιτα ή σε κάψουλες, που η χρησιμοποίησή τους μπορεί να θεωρηθεί προσφορότερη. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν άλλοι τρόποι χορήγησης από το στόμα. Οι δόσεις σε όλα τα ζώα πρέπει να χορηγούνται με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου δοκιμασίας. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα προσθετικά για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Εάν χρειασθεί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά στοιχεία.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Το χρησιμοποιούμενο συνήθως είδος ζώου μη τρωκτικού είναι ο σκύλος, καθορισμένης κατά προτίμηση φυλής. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν άλλα μη τρωκτικά είδη. Πρέπει να χρησιμοποιούνται νέα υγιή ζώα και, στην περίπτωση του σκύλου, η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει κατά προτίμηση σε ηλικία τεσσάρων έως έξι και μέχρι το πολύ εννέα μηνών. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μία μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθεί και στις δύο μελέτες το ίδιο είδος/φυλή.

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον οκτώ ζώα (τέσσερα θηλυκά και τέσσερα αρσενικά) πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επίπεδο δόσης. Ο αριθμός των ζώων στο τέλος της μελέτης πρέπει να είναι επαρκής για μία ουσιαστική εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και μία δόση μάρτυρος. Εκτός της αγωγής με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει να έχουν κατά τα άλλα την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας της δοκιμασίας. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις αλλά όχι θανάτους.

Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλέσει οποιοδήποτε ίχνος τοξικότητας. Στην περίπτωση που υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο πρέπει να την υπερβεί. Η ιδανική περίπτωση είναι το μέσο επίπεδο δόσης να προκαλεί ελάχιστες παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεση δόση, τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Δεν θα πρέπει επίσης να επέλθουν καθόλου θάνατοι στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης καθώς επίσης στους μάρτυρες.

Για ουσίες χαμηλής τοξικότητας είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα ώστε, όταν χορηγούνται μέσα στη δίαιτα, οι ποσότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας να μην επηρεάζουν τις κανονικές απαιτήσεις διατροφής.

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στη δίαιτα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μία σταθερή διαιτητική συγκέντρωση (ppm ή mg/kg τροφής) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης ανάλογα με το βάρος του σώματος των ζώων. Πρέπει να προσδιορισθεί η εναλλακτική μέθοδος που χρησιμοποιείται. Όταν η δόση χορηγείται απευθείας, π.χ. με κάψουλα, η δόση πρέπει να χορηγείται σε παραπλήσιες χρονικές στιγμές κάθε ημέρα και να προσαρμόζεται, ανάλογα με τις ανάγκες, κάθε εβδομάδα, έτσι ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσης ανάλογα με το βάρος του σώματος του ζώου. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη τοξικότητας ουσίας για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιείται συνήθως και στις δύο μελέτες μία παρόμοια δίαιτα.

Οριακή δοκιμασία

Εάν μια μελέτη 90 ημερών, που διεξάγεται σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται με λεπτομέρεια παρακάτω, με επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, ή με υψηλότερο επίπεδο δόσης αναφορικά με ενδεχόμενη ανθρώπινη έκθεση, όπου αυτό είναι γνωστό, δεν παρέχει ενδείξεις τοξικών επιδράσεων, η συνέχιση του πειράματος μπορεί να θεωρηθεί αναγκαία. Για ουσίες χαμηλής τοξικότητας είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα ώστε, όταν χορηγούνται στη δίαιτα οι ποσότητες και οι άλλες ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, να μην επηρεάζουν τις κανονικές απαιτήσεις διατροφής.

Περίοδος παρατήρησης

Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους. Πρέπει επίσης να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

Διαδικασία

Το ιδανικό είναι να λαμβάνουν τα ζώα δόσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας επτά ημέρες την εβδομάδα για μια περίοδο 90 ημερών. Ωστόσο, θεωρείται αποδεκτή, από πρακτική άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα, όταν η ουσία χορηγείται με άλλο τρόπο εκτός από τη δίαιτα.

Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς, χωρίς να περιορίζονται μόνο σ' αυτά. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (καθώς επίσης και για την κατανάλωση νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό) κάθε εβδομάδα καθώς και ζύγιση των ζώων επίσης κάθε εβδομάδα.

Προσεκτική κλινική εξέταση των ζώων πρέπει να διενεργείται καθημερινά και να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα για την ελαχιστοποίηση της απώλειας ζώων από τη δοκιμασία. Στο τέλος της περιόδου της έκθεσης όλα τα επιζώντα ζώα υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα·

β) αιματολογική εξέταση, που συμπεριλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης, ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στην αρχή της δοκιμασίας κατόπιν είτε κάθε μήνα είτε στο μέσο της περιόδου δοκιμασίας, και τελικά στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας·

γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στην αρχή της δοκιμασίας, κατόπιν είτε κάθε μήνα είτε στο μέσο της περιόδου δοκιμασίας, και τελικά στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές της δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και του νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων δοκιμασιών θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας της ουσίας. Προτείνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος/φύλο του ζώου), της τρανσαμινάσης, του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος του ορού [1], της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξεικού οξέος του ορού [2], της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκώματος,

[1] Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.

[2] Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μία επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, του ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δράσης της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων. Τα μη τρωκτικά πρέπει να παραμείνουν νηστικά για ένα χρονικό διάστημα (μέχρι 24 ώρες) πριν ληφθούν δείγματα αίματος·

δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσεως αλλά μόνον όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που θα περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, ο θυρεοειδής (με τους παραθυρεοειδείς) και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί, (η τραχεία), οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα (τα βοηθητικά γεννητικά όργανα), το δέρμα, η χοληδόχος κύστη, ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας, (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο, (οι οφθαλμοί), το στέρνο με μυελό οστών, (το μηριαίο οστούν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας) και (ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνο εάν υπάρξουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στα όργανα και στους ιστούς των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρα και υψηλής δόσης. Πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση στις άλλες ομάδες δόσεων πρέπει να διενεργείται σε όργανα που παρουσιάζουν βλάβες στην ομάδα υψηλής δόσης ή για τα οποία οι κλινικές παρατηρήσεις υπαγορεύουν αυτή την ανάγκη.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες, τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα αποτελέσματα που πρόκυψαν πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος, φυλή ή ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,

— συνθήκες δοκιμασίας,

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,

— επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται επιδράσεις, εφόσον είναι δυνατόν,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων (με ιδιαίτερη έμφαση στα κλινικά ευρήματα),

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,
— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης των ούρων),
— ευρήματα νεκροψίας,
— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,
— συζήτηση των αποτελεσμάτων,
— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου του πειράματος**

Η δοκιμαζόμενη ουσία τίθεται καθημερινά πάνω στο δέρμα σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών. Κατά την περίοδο της αγωγής τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος του πειράματος, υφίστανται νεκροψία.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου του πειράματος**

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Λίγο πριν από τη δοκιμασία το τρίχωμα απομακρύνεται με κούρεμα από τη νωτιαία περιοχή του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί επίσης να απομακρυνθεί με ξύρισμα, που πρέπει όμως να γίνει 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμασία. Επανάληψη του κουρέματος ή ξυρίσματος απαιτείται συνήθως κάθε εβδομάδα περίπου. Κατά το κούρεμα ή το ξύρισμα του τριχώματος πρέπει να καταβληθεί προσοχή ώστε να αποφευχθεί ή εκδορά του δέρματος. Δέκα τοις εκατό τουλάχιστον της επιφάνειας του δέρματος πρέπει να είναι γυμνή για την επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Το βάρος του ζώου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη λήψη της απόφασης σχετικά με την περιοχή που θα πρέπει να απογυμνωθεί και για τις διαστάσεις της επικάλυψης. Κατά τη δοκιμασία στερεών ουσιών, που μπορούν, εφόσον είναι δυνατό, να κονιοποιηθούν, η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να υγρανθεί επαρκώς με νερό ή, εφόσον χρειάζεται, με κατάλληλο έκδοχο για να εξασφαλισθεί καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές δοκιμαζόμενες ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως χωρίς αραίωση. Εφαρμόζεται καθημερινή επίθεση της ουσίας επί πέντε ή επτά ημέρες την εβδομάδα.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο αρουραίος, το κουνέλι ή το ινδικό χοιρίδιο, πλήρους ανάπτυξης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, αλλά η χρήση τους θα απαιτούσε αιτιολόγηση. Στην αρχή του πειράματος, η διαφορά βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % του μέσου βάρους. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη δερματικής τοξικότητας, για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και στελέχη.

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) με υγιές δέρμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επίπεδο δόσης. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο δόσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για μεταγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Επίπεδα δόσεων

Απαιτούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή έκδοχο μάρτυρας εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο. Η περίοδος έκθεσης θα πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες τουλάχιστον την ημέρα. Η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται σε παραπλήσιες χρονικές στιγμές κάθε ημέρα, και η ποσότητα της επιτιθέμενης ουσίας να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (κάθε μία ή δύο εβδομάδες) για τη διατήρηση ενός σταθερού επιπέδου δόσης, με βάση το βάρος του σώματος του ζώου. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να διευκολύνει τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα της ομάδας ελέγχου εκδόχου λαμβάνουν δόσεις κατά τον ίδιο τρόπο όπως οι ομάδες που υφίστανται την αγωγή και λαμβάνουν την ίδια ποσότητα μ' εκείνη που λαμβάνεται από την ομάδα υψηλότερου επιπέδου δόσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί οποιοδήποτε ίχνος τοξικότητας. Στην περίπτωση που υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο θα πρέπει να την υπερβεί. Στην ιδανική περίπτωση το ενδιάμεσο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλεί ελάχιστες παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στη χαμηλή και στην ενδιάμεση ομάδα, καθώς και στην ομάδα μάρτυρα, η επέλευση οποιωνδήποτε θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση αποτελεσμάτων.

Εάν η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας δημιουργήσει σοβαρό ερεθισμό του δέρματος, οι συγκεντρώσεις πρέπει να ελαττωθούν, και αυτό ίσως να έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση ή την απουσία άλλων τοξικών επιδράσεων στο υψηλό επίπεδο δόσης. Εάν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, πιθανόν να χρειαστεί να τερματιστεί η μελέτη και να επαναληφθεί με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Οριακή δοκιμασία

Εάν μια προκαταρκτική μελέτη σε επίπεδο δόσης 1000 mg/kg ή σε υψηλότερο επίπεδο δόσης αναφορικά με ενδεχόμενη ανθρώπινη έκθεση, όπου αυτό είναι γνωστό, δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις, η συνέχιση του πειράματος μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαία.

Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για ενδείξεις τοξικότητας. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

Διαδικασία

Τα ζώα πρέπει να παραμένουν σε χωριστά κλουβιά και το ιδανικό είναι να υποβάλλονται σε αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία επτά ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματισθεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες την ημέρα.

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να επιτίθεται ομοιόμορφα σε έκταση ίση με το 10% περίπου της συνολικής επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση ουσιών υψηλής τοξικότητας, η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όσο το δυνατόν περισσότερη επιφάνεια να καλύπτεται με όσο το δυνατόν λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα.

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η δοκιμαζόμενη ουσία διατηρείται σε επαφή με το δέρμα με τη χρήση πορώδους επίδεσμου και λευκοπλάστη που δεν προκαλεί ερεθισμό. Η περιοχή της έκθεσης πρέπει να καλύπτεται ακόμη με κατάλληλο τρόπο για τη συγκράτηση του επιδέσμου και της δοκιμαζόμενης ουσίας και για την εξασφάλιση της μη κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας από τα ζώα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα συγκράτησης για την πρόληψη της κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, αλλά δεν συνιστάται η πλήρης ακινητοποίηση. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης τα κατάλοιπα της δοκιμαζόμενης ουσίας θα πρέπει να απομακρυνθούν, εφόσον είναι δυνατό με τη χρήση νερού ή κάποιας άλλης κατάλληλης μεθόδου καθαρισμού του δέρματος. Όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους.

Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής, καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απωλείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως είναι ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της μελέτης όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα·

β) αιματολογική εξέταση, που περιλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης, ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας·

γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές της δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων πειραμάτων θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας της ουσίας. Προτείνονται προσδιορισμοί του αβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος του ορού, της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξεικού οξέος του ορού ([1]), της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκώματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μία επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δραστικότητας της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων·

δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσεως αλλά μόνον όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται ο προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί θα πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί (η τραχεία), οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, η χοληδόχος κύστη (εάν υπάρχει), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο (οι οφθαλμοί), (το στέρνο με μυελό των οστών), (το μηριαίον οστούν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), (ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), και (οι εξώφθαλμοι δακρυϊκοί αδένες). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνον εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στο μη θιγέν δέρμα και στο δέρμα που υπέστη αγωγή, καθώς επίσης και στα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρα και υψηλής δόσης.

β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.

γ) Τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσης πρέπει να εξετασθούν.

δ) Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αρουραίοι, οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποστούν ιστοπαθολογική εξέταση για τη διαπίστωση λοίμωξης, γιατί έτσι επιτυγχάνεται μια εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Μπορεί να μην απαιτείται τακτικά πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση των ζώων των ομάδων αυτών, αλλά θα πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.

ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις στις άλλες ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

([1]) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.
([2]) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας θα πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,
- συνθήκες δοκιμασίας,
- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,
- στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,
- επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις, εφόσον είναι δυνατόν,
- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
- περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
- χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
- οφθαλμολογικά ευρήματα,
- αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),
- ευρήματα νεκροψίας,
- λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΠΝΟΗ

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ, 90 ΗΜΕΡΩΝ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Αρκετές ομάδες πειραματοζώων εκτίθενται καθημερινά επί ένα ορισμένο χρονικό διάστημα στη δοκιμαζόμενη ουσία σε προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (μία συγκέντρωση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να βοηθήσει στην παραγωγή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ομάδα εκδόχου, μάρτυρας. Κατά την περίοδο της αγωγής τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος της δοκιμασίας, υφίστανται νεκροψία.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, νεαρά υγιή ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται στις απαιτούμενες ομάδες. Εάν υπάρχει ανάγκη, μπορεί να προστεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία κατάλληλο έκδοχο για να βοηθήσει στην παραγωγή κατάλληλης συγκέντρωσης της ουσίας στην ατμόσφαιρα. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα προσθετικά για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά στοιχεία εάν χρειασθεί.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, το προτιμούμενο είδος είναι ο αρουραίος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστήριο. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το ±20% της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται διά της εισπνοής για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) πρέπει να χρησιμοποιηθούν για κάθε ομάδα του πειράματος. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών αποτελεσμάτων για μεταγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Συγκέντρωση έκθεσης

Απαιτούνται τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις, με μάρτυρα ή μάρτυρα έκδοχο (που να αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του εκδόχου στο υψηλότερο επίπεδο), στην περίπτωση χρησιμοποίησης εκδόχου. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας του πειράματος. Το υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης πρέπει να έχει σαν αποτέλεσμα τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους, ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Όπου υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να την υπερβεί. Στην ιδανική περίπτωση το ενδιάμεσο επίπεδο συγκέντρωσης πρέπει να προκαλεί πολύ μικρές παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στη χαμηλή και στην ενδιάμεση ομάδα, καθώς και στους μάρτυρες, η συχνότητα οποιουδήποτε θανάτου πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Χρόνος έκθεσης

Η διάρκεια της καθημερινής έκθεσης πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες μετά από εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου. Άλλοι χρόνοι διάρκειας μπορούν να εφαρμοσθούν για την ικανοποίηση ιδιαίτερων απαιτήσεων.

Εξοπλισμός

Τα πειράματα πάνω στα ζώα πρέπει να διενεργούνται μέσα σε συσκευές εισπνοής ικανές να διατηρούν μια δυναμική ροή αέρα δώδεκα τουλάχιστων αλλαγών αέρα ανά ώρα, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται θάλαμος, η σχεδίασή του πρέπει να είναι τέτοια ώστε να ελαχιστοποιεί το συνωστισμό των ζώων δοκιμασίας και να μεγιστοποιεί την έκθεσή τους στην εισπνοή της δοκιμαζόμενης ουσίας. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας ενός θαλάμου πρέπει να ορισθεί ότι ο συνολικός «όγκος» των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του δοκιμαστικού θαλάμου. Μπορεί να εφαρμοσθεί η στοματορινική έκθεση, η έκθεση μόνο της κεφαλής ή η έκθεση ολόκληρου του σώματος σε ατομικούς θαλάμους. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις ελαχιστοποιείται η λήψη από άλλες οδούς.

Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για ενδείξεις τοξικότητας καθ' όλη την περίοδο αγωγής και ανάληψης. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

Διαδικασία

Τα ζώα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά, πέντε έως επτά ημέρες την εβδομάδα, για περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματισθεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων.

Η θερμοκρασία κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Στην ιδανική περίπτωση η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται μεταξύ 30 και 70 %, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. πειράματα αεροζόλ) τα επίπεδα αυτά μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμα. Η τροφή και το νερό θα πρέπει να απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Πρέπει να χρησιμοποιείται ένα δυναμικό σύστημα εισπνοής με κατάλληλο σύστημα αναλυτικού ελέγχου της συγκέντρωσης. Για τη δημιουργία κατάλληλων συγκεντρώσεων έκθεσης συνιστάται δοκιμαστικό πείραμα. Η ροή του αέρα πρέπει να διευθετείται για να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια των συνθηκών σε όλο το θάλαμο έκθεσης. Το σύστημα πρέπει να εξασφαλίζει την όσο το δυνατόν ταχύτερη επίτευξη σταθερών συνθηκών έκθεσης.

Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις ή έλεγχοι για τα ακόλουθα:

α) ταχύτητα της ροής του αέρα (συνεχώς)·

β) πραγματική συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας με τη διενέργεια μέτρησης στη ζώνη αναπνοής. Κατά τη διάρκεια της καθημερινής περιόδου έκθεσης η συγκέντρωση δεν θα πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 15 % της μέσης τιμής. Παρ' όλα αυτά όμως, στην περίπτωση σκονών και αεροζόλ, το επίπεδο αυτό ελέγχου μπορεί να μην είναι επιτευκτό, και τότε θα πρέπει να γίνει αποδεκτή μία ευρύτερη διακύμανση. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης οι καθημερινές συγκεντρώσεις πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατό σταθερές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής πρέπει να διενεργείται ανάλυση μεγέθους σωματιδίων για την παρακολούθηση της σταθερότητας των συγκεντρώσεων αεροζόλ. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η ανάλυση πρέπει να διεξάγεται κάθε φορά που είναι απαραίτητο για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή των αιωρουμένων σωματιδίων·

γ) θερμοκρασία και υγρασία·

δ) κατά τη διάρκεια της έκθεσης και μετά από αυτή διενεργούνται παρατηρήσεις και καταγράφονται συστηματικά, ενώ τηρούνται ατομικοί φάκελοι για κάθε ζώο. Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους. Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (καθώς επίσης και για την κατανάλωση νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό), καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα. Η

τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την κατά το μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απώλειας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως είναι ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της έκθεσης, όλα τα επιζήσαντα ζώα αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα·

β) αιματολογική εξέταση, που συμπεριλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος περιόδου δοκιμασίας·

γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και του νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων δοκιμασιών θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας την ουσίας. Προτείνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος του ορού (¹), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξεικού οξέος του ορού (²), της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκώματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μια επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας-οξέος/βάσης, της μεθαμοσφαιρίνης και της δραστικότητας της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων·

δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσης, αλλά μόνο όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται να ληφθεί υπόψη ο προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που θα περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, οι πνεύμονες —που πρέπει να αφαιρεθούν ανέπαφοι, να ζυγισθούν και να τύχουν επεξεργασίας με κατάλληλο στερεωτικό, έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η διατήρηση της δομής του πνεύμονα (η έκχυση με στερεωτικό θεωρείται σαν αποτελεσματική διαδικασία)—, οι ρινοφαρυγγικοί ιστοί, ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί, η τραχεία, οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα (τα βοηθητικά γεννητικά όργανα), (το δέρμα), η χοληδόχος κύστη (εάν υπάρχει), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο (οι οφθαλμοί), το στέρνο με μυελό των οστών (το μηριαίο οστούν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικό, μεσοθωρακικό και οσφυικό). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνο εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στην αναπνευστική οδό και στα άλλα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρες και υψηλής δόσης.

β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.

γ) Τα όργανα, που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσης πρέπει να εξετασθούν.

δ) Οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποστούν ιστοπαθολογική εξέταση, γιατί μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Μπορεί να μην απαιτείται πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση στα ζώα των ομάδων επί τακτικής βάσης αλλά πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.

ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις σε άλλες ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

(¹) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.
(²) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες, τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες του περιβάλλοντος, δίαιτα, κλπ.,

— συνθήκες δοκιμασίας:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης: περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή του αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε πειραματικό θάλαμο, σε περίπτωση χρησιμοποίησής του. Πρέπει να γίνει περιγραφή του εξοπλισμού για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, εφόσον είναι δυνατό, της σταθερότητας των συγκεντρώσεων αεροζόλ ή του μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία: τα δεδομένα αυτά πρέπει να εμφανίζονται σε μορφή πίνακα και να παρουσιάζονται με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή απόκλιση), και πρέπει να περιλαμβάνουν:

α) ταχύτητα ροής του αέρα μέσα από τον εξοπλισμό εισπνοής·

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα·

γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα δοκιμαζόμενης ουσίας που εισάγεται στον εξοπλισμό εισπνοής διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα)·

δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε·

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις μέσα στη ζώνη αναπνοής του πειράματος·

ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),

— στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και συγκέντρωση,

— επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν επέφερε κανένα αποτέλεσμα, εφόσον είναι δυνατόν,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΕΡΑΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις ή συγκεντρώσεις, τουλάχιστον κατά τη διάρκεια του τμήματος εκείνου της εγκυμοσύνης που καλύπτει την περίοδο της οργανογένεσης, σε διάφορες ομάδες εγκύων πειραματοζώων (μία δόση ανά ομάδα). Λίγο πριν από την αναμενόμενη ημερομηνία του τοκετού, θανατώνεται η μητέρα, αφαιρείται η μήτρα και εξετάζεται το περιεχόμενο. Η μέθοδος αυτή καλύπτει την εμβρυοτοξικότητα και την εμβρυονική (ή νεογνική) τοξικότητα.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προπαρασκευή

Υγιή νεαρά, ενήλικα, παρθένα θηλυκά ζώα ανάλογης ηλικίας και μεγέθους εγκλιματίζονται προς τις εργαστηριακές συνθήκες επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από το πείραμα και κατόπιν ζευγαρώνονται με αρσενικά αποδειγμένης γονιμότητας. Τα γονιμοποιημένα θηλυκά ζώα ξεχωρίζονται και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής.

Το ζευγάρωμα μπορεί να επιτευχθεί κατά φυσικό τρόπο ή με τεχνητή γονιμοποίηση. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται καθημερινά στα θηλυκά ζώα αρχίζοντας αμέσως μετά την εμφύτευση και συνεχίζοντας σε όλη τη διάρκεια της περιόδου οργανογένεσης. Μία ημέρα πριν από το τέλος, τα έμβρυα αποσπώνται με υστερεκτομή και εξετάζονται για ανωμαλίες των σπλάχνων ή του σκελετού, συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης της ανάπτυξης, της καθυστερημένης οστεοποίησης και των εντερικών αιμορραγιών.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Τα είδη που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο αρουραίος, ο ποντικός, ο κρικητός ο γνήσιος (χάμστερ) και το κουνέλι. Τα προτιμούμενα είδη είναι ο αρουραίος και το κουνέλι. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστήριο. Η ποικιλία του ζώου δεν πρέπει να παρουσιάζει χαμηλή γονιμότητα και πρέπει να χαρακτηρίζεται για την αντίδρασή της στα τερατογόνα. Τα ζώα πρέπει να διαμένουν σε χωριστά κλουβιά.

Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο δόσης απαιτούνται τουλάχιστον είκοσι έγκυοι αρουραίοι, ποντικοί ή κρικητοί (χάμστερ) ή δώδεκα έγκυα κουνέλια. Αυτό έχει σαν σκοπό την εξασφάλιση παραγωγής επαρκών νεογνών που να επιτρέπουν μια εκτίμηση της τερατογενετικής ικανότητας της ουσίας.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες δόσεων και μια ομάδα μάρτυρας. Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται μία ομάδα μάρτυρας για το έκδοχο, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται με έκδοχο. Στην περίπτωση χρησιμοποίησης εκδόχου, πρέπει να είναι γνωστές οι τοξικολογικές ιδιότητές του, που δεν πρέπει να είναι τερατογενετικές ή να παρουσιάζουν επιδράσεις στην αναπαραγωγή. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη

ουσία, τα ζώα στις ομάδες μάρτυρες πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνη της ομάδας δοκιμασίας. Εκτός έαν περιοριστεί από το φυσικό/χημικό χαρακτήρα ή τις βιολογικές ιδιότητες της ουσίας, το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει θεωρητικά να προκαλεί κάποια έκδηλη μητρική τοξικότητα, όπως είναι η ελαφρή απώλεια βάρους, αλλά όχι περισσότερο από 10% μητρικούς θανάτους. Το χαμηλό επίπεδο δόσης δεν θα πρέπει να προκαλεί παρατηρήσιμες επιδράσεις που να μπορούν να αποδοθούν στη δοκιμαζόμενη ουσία. Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να ορισθούν κατά γεωμετρική πρόοδο μεταξύ των επιπέδων υψηλής και χαμηλής δόσης.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσιών χαμηλής τοξικότητας, εάν ένα επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg τουλάχιστον δεν παράγει ίχνη εμβρυοτοξικότητας ή τερατογενετικότητας, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να μη θεωρηθούν απαραίτητες.

Χρόνος έκθεσης

Η ημέρα 0 στη δοκιμασία είναι η ημέρα κατά την οποία παρατηρείται το κολπικό βύσμα ή/και το σπέρμα (στην περίπτωση που είναι εφικτό). Η περίοδος χορήγησης δόσεων πρέπει να καλύπτει την περίοδο της βασικής οργανογένεσης. Η περίοδος αυτή μπορεί να ορισθεί ανάμεσα στην έκτη και στη δέκατη πέμπτη ημέρα για τον αρουραίο και τον ποντικό, στην έκτη και στη δέκατη τέταρτη ημέρα για τον κρικητό ή στην έκτη και στη δέκατη όγδοη ημέρα για το κουνέλι. Εάν η ημέρα 0 βασίζεται στην παρατήρηση του ζευγαρώματος ή της τεχνητής γονιμοποίησης, οι παραπάνω χρόνοι πρέπει να διορθωθούν με την προσθήκη μιας ημέρας. Εναλλακτικά, η περίοδος χορήγησης δόσεων μπορεί να επεκταθεί μέχρι μία ημέρα περίπου πριν από την αναμενόμενη ημερομηνία τοκετού.

Περίοδος παρατήρησης

Προσεκτική κλινική εξέταση πρέπει να διενεργείται μία φορά τουλάχιστον κάθε ημέρα. Πρόσθετες παρατηρήσεις πρέπει να διενεργούνται καθημερινά με τη λήψη κατάλληλων μέτρων για την ελαχιστοποίηση της απώλειας ζώων από τη μελέτη.

Διαδικασία

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα με καθετήρα στομάχου την ίδια ώρα κατά προσέγγιση κάθε ημέρα.

Τα θηλυκά πειραματόζωα λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια της σχετικής περιόδου αγωγής. Η δόση μπορεί να βασίζεται στο βάρος των θηλυκών κατά την έναρξη της αγωγής ή, εναλλακτικά, εν όψει της ταχείας απόκτησης βάρους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τα ζώα μπορούν να ζυγίζονται περιοδικά και οι δόσεις να βασίζονται στη πλέον πρόσφατη μέτρηση βάρους. Οι ενδείξεις τοξικότητας πρέπει να καταγράφονται μόλις παρατηρούνται, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους. Τα θηλυκά που παρουσιάζουν σημεία αποβολής ή πρόωρου τοκετού πρέπει να θανατώνονται και να υφίστανται προσεκτική μακροσκοπική εξέταση. Η περίοδος παρατήρησης μετά την αγωγή πρέπει να συνεχιστεί μέχρι την προηγούμενη ημέρα περίπου πριν από τον τοκετό. Αυτό έχει σαν σκοπό να καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της περιόδου εγκυμοσύνης αλλά να αποφευχθούν επιπλοκές στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να προκύψουν μετά από φυσικό τοκετό.

Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς, αλλά να μην περιορίζονται μόνο σ' αυτά. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση της τροφής καθώς επίσης και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Νεκροψία

Εφόσον επέλθει θάνατος κατά τη διάρκεια της μελέτης ή κατά το τέλος αυτής, οι μητέρες πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές που δυνατόν να επηρέασαν την εγκυμοσύνη. Αμέσως μετά το θάνατο πρέπει να αφαιρεθεί η μήτρα και να εξεταστεί το περιεχόμενό της για εμβρυϊκούς θανάτους και για τον αριθμό των ζωντανών εμβρύων. Είναι συνήθως δυνατό να εκτιμηθεί ο χρόνος θανάτου μέσα στη μήτρα, όπου αυτός έχει επέλθει. Στους ποντικούς και τα κουνέλια, ο αριθμός των ωχρών σωματίων της ωοθήκης μπορεί να προσδιοριστεί. Πρέπει να προσδιοριστεί το φύλο των εμβρύων και να γίνει ζύγισή τους χωριστά για το καθένα, να καταγραφεί το βάρος τους καθώς επίσης και το προκύπτον μέσο εμβρυϊκό βάρος. Μετά την αφαίρεση, κάθε έμβρυο πρέπει να εξεταστεί εξωτερικά. Για τους αρουραίους, τα ποντίκια και τους κρικητούς, το ένα τρίτο μέχρι και το ήμισυ του αριθμού των νεογνών κάθε μητέρας πρέπει να εξεταστεί για ανωμαλίες του σκελετού, ενώ το υπόλοιπο μέρος πρέπει να προετοιμαστεί και να εξεταστεί για ανωμαλίες μαλακού ιστού με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων. Για τα κουνέλια, κάθε έμβρυο πρέπει να εξεταστεί με προσεκτική ανατομή για σπλαγχνικές ανωμαλίες και έπειτα για ανωμαλίες του σκελετού.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με μορφή πίνακα, που να παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που κατέστησαν έγκυα, τον αριθμό και τα ποσοστά των ζωντανών εμβρύων με οποιεσδήποτε ανωμαλίες μαλακού ιστού ή σκελετού, και τέλος της σχέση τους προς ιδιαίτερες ομάδες νεογνών. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες του περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,

— συνθήκες δοκιμασίας,

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά δόση,

— επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις (εφόσον είναι δυνατόν),

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανώμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— διάρκεια της εγκυμοσύνης και στοιχεία για τα νεογνά που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα (συμπεριλαμβανομένων ιστορικών στοιχείων),

— στοιχεία εμβρύων (ζωντανά/νεκρά, φύλο, βλάβες μαλακού ιστού και σκελετού),

— στοιχεία νεογνών (ζωντανά/νεκρά, φύλο, βλάβες μαλακού ιστού και σκελετού για κάθε νεογνό),

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται κανονικά επτά ημέρες την εβδομάδα, από κατάλληλη οδό, σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων (μία δόση ανά ομάδα), για ένα σημαντικό μέρος της ζωής τους. Κατά τη διάρκεια και μετά την έκθεσή τους στη δοκιμαζόμενη ουσία, τα πειραματόζωα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση ενδείξεων τοξικότητας.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Το προτιμούμενο είδος είναι ο αρουραίος. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, μπορούν να χρησιμοποιούν άλλα είδη ζώων (τρωκτικά ή μη τρωκτικά). Πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως στα εργαστήρια, και η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό.

Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20% της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που έχει διεξαχθεί υποχρόνια μελέτη τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το στόμα για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μία μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Στην περίπτωση των τρωκτικών, πρέπει να χρησιμοποιηθούν 40 τουλάχιστον ζώα (20 θηλυκά και 20 αρσενικά) σε κάθε επίπεδο δόσης και συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν έχουν προγραμματιστεί θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από το τέλος της μελέτης.

Στην περίπτωση των μη τρωκτικών, είναι αποδεκτός μικρότερος αριθμός ζώων, τουλάχιστον όμως τέσσερα ζώα ανά φύλο ανά ομάδα.

Επίπεδα δόσεων και συχνότητα έκθεσης

Εκτός από τη συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλό για να προκαλέσει σαφή σημεία τοξικότητας, χωρίς να προκαλέσει όμως υπερβολική θνησιμότητα. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν θα πρέπει να προκαλέσει οποιαδήποτε τοξικότητα. Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να κυμαίνονται σε ένα μέσο επίπεδο μεταξύ της υψηλής και χαμηλής δόσης. Για την επιλογή των επιπέδων δόσεων θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στοιχεία από προηγούμενες δοκιμασίες και μελέτες τοξικότητας.

Η συχνότητα έκθεσης είναι κανονικά καθημερινή. Η χημική ουσία πρέπει να είναι συνεχώς διαθέσιμη, εφόσον χορηγείται με το πόσιμο νερό ή αναμειγνύεται στη δίαιτα.

Ομάδες μάρτυρες

Πρέπει να χρησιμοποιείται συγχρόνως ομάδα μάρτυρας όμοια από κάθε άποψη με τις ομάδες που υποβάλλονται σε έκθεση, εκτός ως προς την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία.

Σε ειδικές περιστάσεις, όπως σε μελέτες στις οποίες η λήψη της ουσίας γίνεται με εισπνοή, σε μελέτες που αφορούν αεροζόλ ή τη χρήση ενός γαλακτοματοποιητικού μέσου μη χαρακτηρισμένης βιολογικής δράσης, σε μελέτες στις οποίες η ουσία λαμβάνεται από το στόμα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί παράλληλα αρνητική ομάδα μάρτυρας. Τα ζώα της ομάδας αρνητικού ελέγχου έχουν την ίδια μεταχείριση όπως όλα τα άλλα πειραματόζωα, με την εξαίρεση ότι η ομάδα αυτή ελέγχου δεν θα πρέπει να εκτεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία ή σε οποιοδήποτε έκδοχο.

Οδός λήψης

Οι δύο κύριες οδοί λήψης είναι από το στόμα και με την εισπνοή. Η επιλογή τη οδού λήψης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της δοκιμαζόμενης ουσίας και από την πιθανή οδό έκθεσης για τους ανθρώπους.

Η χρήση της δερματικής οδού παρουσιάζει σημαντικά πρακτικά προβλήματα. Η χρόνια συστηματική τοξικότητα που προκύπτει από διαδερμική απορρόφηση μπορεί κανονικά να συναχθεί από τα αποτελέσματα της μελέτης με λήψη της ουσίας από το στόμα και η γνώση της έκτασης της διαδερμικής απορρόφησης να προκύψει από προηγούμενα πειράματα διαδερμικής τοξικότητας.

Μελέτες στις οποίες η ουσία λαμβάνεται από το στόμα

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό, και εάν η οδός εισαγωγής αποτελεί μια οδό από την οποία μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι, προτιμάται η λήψη από το στόμα εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις.

Τα ζώα μπορούν να λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία στη δίαιτά τους, διαλυμένη σε πόσιμο νερό, ή σε κάψουλες.

Το ιδανικότερο είναι να εφαρμόζεται καθημερινή χορήγηση δόσεων επί επτά ημέρες την εβδομάδα, γιατί η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα πιθανόν να επιτρέψει ανάληψη ή την υποχώρηση της τοξικότητας κατά την περίοδο που δεν χορηγούνται δόσεις, και έτσι να επηρεάσει το αποτέλεσμα και τη μετέπειτα εκτίμηση. Ωστόσο, από πρακτική άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα θεωρείται σαν αποδεκτή.

Μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή

Επειδή οι μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή παρουσιάζουν πιο περίπλοκα τεχνικά προβλήματα απ' ό,τι οι άλλες οδοί λήψης, παρέχονται εδώ λεπτομερέστερες οδηγίες γι' αυτόν τον τρόπο λήψης. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπορεί να αποτελέσει μια αποδεκτή εναλλακτική λύση σε ιδιαίτερες περιπτώσεις.

Οι μακροπρόθεσμες εκθέσεις σχεδιάζονται συνήθως με βάση την υφιστάμενη προοπτική για ανθρώπινη έκθεση, εκθέτοντας τα ζώα καθημερινά επί έξι ώρες μετά από την εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου, επί πέντε ημέρες την εβδομάδα (διαλείπουσα έκθεση), ή, σε ενδεχόμενη έκθεση περιβάλλοντος, 22 έως 24 ώρες έκθεσης ανά ημέρα επί επτά ημέρες την εβδομάδα (συνεχής έκθεση), με μία ώρα περίπου την ημέρα για διατροφή των ζώων σε παραπλήσια ώρα και για συντήρηση του θαλάμου. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ζώα εκτίθενται συνήθως με μια καθορισμένη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας. Μία βασική διαφορά που πρέπει να ληφθεί υπόψη μεταξύ διαλείπουσας και συνεχούς έκθεσης είναι ότι στην πρώτη υπάρχει μία δεκαεπτάωρη μέχρι δεκαοκτάωρη περίοδος κατά την οποία τα ζώα μπορούν να αναλάβουν από τις επιδράσεις της κάθε καθημερινής έκθεσης, καθώς επίσης και μία ακόμη μεγαλύτερη περίοδος ανάληψης κατά τα σαββατοκύριακα.

Η επιλογή της διαλείπουσας ή συνεχούς έκθεσης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και από τις συνθήκες της ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία τις οποίες πρέπει να απομιμηθεί. Παρ' όλα αυτά όμως, πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες τεχνικές δυσκολίες. Επί παραδείγματι, τα πλεονεκτήματα της συνεχούς έκθεσης για την απομίμηση συνθηκών περιβάλλοντος μπορεί να αντισταθμιστούν από την ανάγκη χορήγησης νερού και τροφής κατά τη διάρκεια της έκθεσης και από την ανάγκη περισσότερο περίπλοκων (και αξιόπιστων) τεχνικών παραγωγής και παρακολούθησης αεροζόλ και ατμών.

Θάλαμοι έκθεσης

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται σε θαλάμους εισπνοής που είναι σχεδιασμένοι να υφίστανται μία δυναμική ροή δώδεκα τουλάχιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης στην ουσία. Οι θάλαμοι μάρτυρες και θάλαμοι έκθεσης πρέπει να είναι τελείως όμοιοι στην κατασκευή και στη σχεδίαση έτσι ώστε να εξασφαλίζουν συγκρίσιμες συνθήκες έκθεσης από όλες τις απόψεις, με την εξαίρεση της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία. Μία ελαφρή αρνητική πίεση μέσα στο θάλαμο διατηρείται συνήθως για την πρόληψη διαρροής της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γύρω χώρο. Οι θάλαμοι πρέπει να ελαχιστοποιούν το συνωστισμό των πειραματόζωων. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας του θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του όγκου του θαλάμου.

Πρέπει να διενεργηθούν οι παρακάτω μετρήσεις ή έλεγχοι:

i) Ροή αέρα: η ταχύτητα ροής του αέρα διά μέσου του θαλάμου πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς.

ii) Συγκέντρωση: κατά τη διάρκεια της περιόδου καθημερινής έκθεσης η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν θα πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 15% της μέσης τιμής.

iii) Θερμοκρασία και υγρασία: για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 2°C και η υγρασία μέσα στο θάλαμο σε 30 έως 70%, εκτός από τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται νερό για την εναιώρηση της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα του θαλάμου. Κατά προτίμηση, τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία θα πρέπει να παρακολουθούνται συνεχώς.

iv) Μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων στην ατμόσφαιρα του θαλάμου πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα υγρά ή στερεά αεροζόλ. Τα σωματίδια αεροζόλ πρέπει να είναι αναπνεύσιμου μεγέθους για το χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο. Δείγματα ατμόσφαιρας θαλάμου πρέπει να λαμβάνονται στην περιοχή αναπνοής των ζώων. Το δείγμα αέρα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της κατανομής των σωματιδίων στα οποία εκτίθενται τα ζώα και πρέπει να αντιπροσωπεύει, επί σταθμικής βάσης, όλο το εναιωρούμενο αεροζόλ, ακόμη και όταν μεγάλη ποσότητα από το αεροζόλ δεν είναι αναπνεύσιμη. Οι αναλύσεις μεγέθους πρέπει να διενεργούνται συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερότητα του αεροζόλ, και μετέπειτα, κατά τη διάρκεια των εκθέσεων, μόνον εφόσον παρίσταται ανάγκη, για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή σωματιδίων στα οποία εκτέθηκαν τα ζώα.

Διάρκεια της μελέτης

Η διάρκεια της περιόδου χορήγησης πρέπει να είναι τουλάχιστον δώδεκα μήνες.

Διαδικασία

Παρατηρήσεις

Μια φορά τουλάχιστον κάθε μέρα πρέπει να διεξάγεται προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις πρέπει να διενεργούνται καθημερινά με λήψη κατάλληλων μέτρων για την ελαχιστοποίηση της απώλειας ζώων από τη μελέτη, π.χ. νεκροψία ή κατάψυξη των ζώων εκείνων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των ασθενών ή των ετοιμοθάνατων ζώων. Πρέπει να διενεργούνται προσεκτικές παρατηρήσεις για την ανίχνευση της εμφάνισης και της πορείας όλων των τοξικών επιδράσεων καθώς επίσης και για την ελαχιστοποίηση των απωλειών λόγω ασθενειών, αυτόλυσης των ιστών ή κανιβαλισμού.

Πρέπει να καταγράφονται για όλα τα ζώα κλινικές ενδείξεις, που περιλαμβάνουν νευρολογικές και οφθαλμολογικές μεταβολές, καθώς επίσης και οι θάνατοι. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος της εμφάνισης και εξέλιξης των τοξικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένων των ύποπτων όγκων.

Το βάρος του σώματος πρέπει να καταγράφεται ατομικά για όλα τα ζώα μια φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της περιόδου της μελέτης, και μετέπειτα μια φορά τουλάχιστον κάθε τέσσερις εβδομάδες. Η λήψη τροφής πρέπει να καθορίζεται κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της μελέτης, και μετέπειτα κατά τρίμηνα περίπου διαστήματα, εκτός εάν οι μεταβολές στην κατάσταση της υγείας ή στο βάρος του σώματος υπαγορεύουν τη λήψη άλλων μέτρων.

Αιματολογική εξέταση

Αιματολογική εξέταση (π.χ. περιεχόμενο αιμοσφαιρίνης, όγκος συσσωρευμένων κυττάρων, συνολικός αριθμός ερυθρών κυττάρων αίματος, συνολικός αριθμός λευκών κυττάρων αίματος και αιματοπεταλίων, ή άλλες μετρήσεις της πηκτικής ικανότητας του αίματος) πρέπει να διενεργείται στους τρεις μήνες, έξι μήνες, και μετέπειτα κατά διαστήματα έξι περίπου μηνών, καθώς επίσης και κατά το τέλος του πειράματος, σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες. Εάν είναι δυνατόν, οι αιμοληψίες πρέπει να γίνουν από τους ίδιους αρουραίους σε κάθε ένα από τα παραπάνω ανεφερθέντα χρονικά διαστήματα. Επίσης, πρέπει να ληφθεί ένα προπειραματικό δείγμα από μη τρωκτικά.

Εάν οι κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν μια επιδείνωση της υγείας των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να διενεργηθεί μια μέτρηση του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος των προσβληθέντων ζώων.

Διαφορική μέτρηση του αίματος διενεργείται στα δείγματα εκείνων των ζώων που ανήκουν στην ομάδα της υψηλότερης δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Μετρήσεις του διαφορικού τύπου του αίματος διενεργούνται για την επόμενη ομάδα ή ομάδες χαμηλότερης δόσης μόνον εάν υπάρχει βασική διαφορά μεταξύ της ομάδας υψηλότερης δόσης και των ομάδων μαρτύρων, ή εάν ενδεικνυται από παθολογικά ευρήματα.

Ανάλυση ούρων

Δείγματα ούρων από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες (εάν είναι δυνατόν από τους ίδιους αρουραίους και κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στις αιματολογικές εξετάσεις) θα πρέπει να συγκεντρώνονται για ανάλυση. Οι παρακάτω μετρήσεις πρέπει να γίνονται είτε σε μεμονωμένα ζώα είτε σε συγχωνευμένο δείγμα ανά φύλο ανά ομάδα για τα τρωκτικά:

— εμφάνιση: όγκος και πυκνότητα για κάθε ζώο χωριστά·

— πρωτεΐνη, γλυκόζη, κετόνες, λανθάνουσα αιμορραγία (ημιποσοτικά)·

— μικροσκοπική εξέταση ιζήματος (ημιποσοτικά).

Κλινική χημική ανάλυση

Κατά διαστήματα έξι μηνών περίπου και στο τέλος της μελέτης λαμβάνονται δείγματα αίματος για κλινικές χημικές μετρήσεις από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες, αν είναι δυνατόν, από τους ίδιους αρουραίους σε κάθε χρονικό διάστημα. Επίσης, πρέπει να ληφθεί ένα προπειραματικό δείγμα από τα μη τρωκτικά. Προπαρασκευάζεται πλάσμα από τα δείγματα αυτά και γίνονται οι παρακάτω μετρήσεις:

— συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης,

— συγκέντρωση αλβουμίνης,

— δοκιμασίες λειτουργίας του ήπατος [όπως είναι η δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος (¹) και της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξεικού οξέος (²)], η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης,

— ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, όπως είναι η νηστεία γλυκόζης του αίματος,

— δοκιμασίες λειτουργίας νεφρού, όπως είναι το άζωτο ουρίας του αίματος.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία, που περιλαμβάνει εκείνα που πέθαναν κατά τη διάρκεια του πειράματος ή τα ετοιμοθάνατα ζώα που θανατώθηκαν. Πριν από τη θανάτωση όλων των ζώων, πρέπει να ληφθούν δείγματα αίματος από όλα τα ζώα για μετρήσεις του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος. Όλες οι μακροσκοπικά ορατές βλάβες, οι όγκοι ή οι βλάβες που προκαλούν υποψία για την ύπαρξη όγκων πρέπει να διατηρηθούν. Πρέπει να γίνει προσπάθεια για τη συσχέτιση όλων των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

Όλα τα όργανα και οι ιστοί πρέπει να διατηρηθούν για ιστοπαθολογική εξέταση. Αυτή συνήθως αφορά τα παρακάτω όργανα και ιστούς: ο εγκέφαλος (³) (μυελός/γέφυρα εγκεφάλου, παρεγκεφαλικός και εγκεφαλικός φλοιός), η υπόφυση, ο θυρεοειδής (συμπεριλαμβανομένου του παραθυρεοειδούς), ο θύμος, οι πνεύμονες (συμπεριλαμβανομένης της τραχείας), η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ (³), η σπλήνα, οι νεφροί (³), τα επινεφρίδια (³), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η μήτρα, η ουροδόχος κύστη, οι λεμφαδένες, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες (³), τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο μαστικός αδένας θήλεος, το δέρμα, το μυϊκό σύστημα, το περιφερικό νεύρο, ο νωτιαίος μυελός (αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), το στέρνο με μυελό των οστών και το μηριαίον οστούν (συμπεριλαμβανομένης της άρθρωσης) και οι οφθαλμοί.

Η διόγκωση των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης με στερεωτικό αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για τη διατήρηση των ιστών αυτών· η διόγκωση των πνευμόνων σε μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή είναι βασική για κατάλληλη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε ειδικές μελέτες, όπως είναι οι μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή, πρέπει να μελετηθεί ολόκληρη η αναπνευστική οδός συμπεριλαμβανομένης της ρινός, του φάρυγγα και του λάρυγγα.

Εάν διεξαχθούν άλλες κλινικές εξετάσεις, οι πληροφορίες που θα ληφθούν από τις διαδικασίες αυτές πρέπει να είναι διαθέσιμες πριν από την μικροσκοπική εξέταση, γιατί μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό μέσο καθοδήγησης για τον παθολόγο.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Όλες οι ορατές μεταβολές, ιδιαίτερα οι όγκοι και οι άλλες βλάβες που παρουσιάζονται σε οποιοδήποτε όργανο πρέπει να εξεταστούν μικροσκοπικά. Επίσης, συνιστώνται οι παρακάτω διαδικασίες:

α) Μικροσκοπική εξέτασή όλων των διατηρημένων οργάνων και ιστών με πλήρη περιγραφή όλων των βλαβών που βρέθηκαν για:

   1. όλα τα ζώα που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης και
   2. όλα τα ζώα της ομάδας του υψηλότερου επιπέδου δόσης και των ομάδων μαρτύρων.

β) Τα όργανα ή οι ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες, που προκλήθηκαν ή που υπάρχουν υπόνοιες ότι προκλήθηκαν από τη δοκιμαζόμενη ουσία, εξετάζονται επίσης στις ομάδες χαμηλότερης δόσης.

γ) Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα της δοκιμασίας παρέχει ενδείξεις μείωσης της κανονικής διάρκειας ζωής των ζώων ή επαγωγής επιδράσεων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια τοξική αντίδραση, πρέπει να εξεταστεί το επόμενο επίπεδο χαμηλότερης δόσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

δ) Πληροφορίες για τη συχνότητα εμφάνισης βλαβών, που συνήθως παρουσιάζονται στην ποικιλία των χρησιμοποιούμενων ζώων, κάτω από τις ίδιες εργαστηριακές συνθήκες, δηλαδή ιστορικά δεδομένα ελέγχου, είναι απαραίτητα για την ορθή αξιολόγηση της σημασίας των μεταβολών που παρατηρούνται στα εκτιθέμενα ζώα.

(¹) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.

(²) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασκαρτικού οξέος του ορού.

(³) Τα όργανα αυτά, από δέκα ζώα ανά φύλο ανά ομάδα για τα τρωκτικά και όλα τα μη τρωκτικά και επιπλέον ο θυρεοειδής (με τον παραθυρεοειδή) για όλα τα μη τρωκτικά, πρέπει να ζυγιστούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα του πειράματος τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή του πειράματος, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες και το ποσοσό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες του περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.

— συνθήκες δοκιμασίας:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης:

περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε θάλαμο δοκιμασίας, εφόσον χρησιμοποιηθεί. Πρέπει επίσης να περιγραφεί ο εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, εφόσον χρειάζεται, της σταθερότητας της συγκέντρωσης αεροζόλ ή μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία:

τα δεδομένα αυτά πρέπει να συνοψισθούν με μορφή πίνακα και να παρουσιαστούν με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή διακύμανση) και πρέπει να περιλαμβάνουν:

α) ταχύτητες ροής του αέρα διαμέσου της συσκευής εισπνοής·

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα·

γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που εισάγεται στη συσκευή εισπνοής, διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα)·

δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε·

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στη ζώνη αναπνοής της δοκιμασίας·

ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης κατά δόση και φύλο,

— επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο που παρατηρήθηκε κάθε ανωμαλία και η μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,

— κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμαζόμενη ουσία λαμβάνεται κανονικά επτά ημέρες την εβδομάδα, από κατάλληλη οδό, σε αρκετές ομάδες πειραματοζώων (μία δόση ανά ομάδα για το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους). Κατά τη διάρκεια και μετά την έκθεση στην δοκιμαζόμενη ουσία, τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση ενδείξεων τοξικότητας, και ιδιαίτερα για την ανάπτυξη όγκων.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, νέα υγιή ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται στις απαιτούμενες ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες.

Πειραματόζωα

Το προτιμούμενο είδος είναι ο αρουραίος. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών που έχουν διεξαχθεί κατά το παρελθόν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη ζώων (τρωκτικά ή μη τρωκτικά). Πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστηριακές μελέτες και η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει το συντομότερο δυνατόν μετά από τον απογαλακτισμό.

Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που έχει διεξαχθεί υποχρόνια μελέτη με λήψη της ουσίας από το στόμα για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν 100 τουλάχιστον ζώα (50 θηλυκά και 50 αρσενικά) σε κάθε επίπεδο δόσης και συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν έχουν προγραμματισθεί θανατώσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης, ο αριθμός πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται, εκτός από τη συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα, τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλό ώστε να επιφέρει σημεία ελάχιστης τοξικότητας, όπως είναι μία ελαφρή ύφεση στην απόκτηση βάρους του σώματος (λιγότερο από 10 %), χωρίς να μεταβάλλει αισθητά την κανονική διάρκεια ζωής λόγω επιδράσεων που δεν σχετίζονται με όγκους.

Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να επηρεάζει την κανονική ανάπτυξη, εξέλιξη και μακροβιότητα του ζώου ή να προκαλεί οποιαδήποτε ένδειξη τοξικότητας. Γενικά, η δόση αυτή δεν πρέπει να είναι χαμηλότερη από 10 % από την υψηλή δόση.

Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να οριστούν σ' ένα μέσο επίπεδο μεταξύ της υψηλής και χαμηλής δόσης.

Κατά την επιλογή των επιπέδων δόσεων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στοιχεία από προηγούμενες δοκιμασίες και μελέτες τοξικότητας.

Η συχνότητα της έκθεσης στην ουσία είναι κανονικά καθημερινή. Η χημική ουσία πρέπει να είναι συνεχώς διαθέσιμη, εφόσον χορηγείται με το πόσιμο νερό ή αναμειγνύεται μέσα στο διαιτολόγιο.

Μάρτυρες

Πρέπει να χρησιμοποιείται μια συμπράττουσα ομάδα μάρτυρας, τελείως όμοια από κάθε άποψη με τις εκτιθέμενες ομάδες, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία.

Σε ειδικές περιστάσεις, όπως είναι στις μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή, που αφορούν αεροζόλ ή τη χρήση γαλακτοματοποιητικής ουσίας μη χαρακτηρισμένης βιολογικής δράσης σε μελέτες λήψης της ουσίας από το στόμα, πρέπει να χρησιμοποιείται μια πρόσθετη ομάδα μάρτυρας η οποία δεν εκτίθεται στο έκδοχο.

Οδός λήψης

Οι τρεις κύριες οδοί λήψης είναι από το στόμα, από το δέρμα και με την εισπνοή. Η επιλογή της οδού λήψης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της δοκιμαζόμενης ουσίας και από την πιθανή μορφή της έκθεσης των ανθρώπων σ' αυτήν.

Δοκιμασίες τοξικότητας ουσιών με λήψη από το στόμα

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό και εάν η οδός εισαγωγής αποτελεί μια οδό από την οποία μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι, προτιμάται η λήψη από το στόμα, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις. Τα ζώα μπορεί να λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία στο διαιτολόγιό τους, διαλυμένη σε πόσιμο νερό, ή μέσα σε κάψουλες.

Στην ιδανικότερη περίπτωση οι δόσεις χορηγούνται επί επτά ημέρες την εβδομάδα, επειδή η χορήγηση επί πέντε ημέρες την εβδομάδα επιτρέπει την ανάληψη από την τοξικότητα ή την υποχώρησή της κατά την περίοδο που δεν χορηγούνται δόσεις, και έτσι επηρεάζει το αποτέλεσμα και την μετέπειτα αξιολόγηση. Ωστόσο, από πρακτική κυρίως άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα θεωρείται σαν αποδεκτή.

Δοκιμασίες τοξικότητας ουσιών με λήψη από το δέρμα

Η δερματική έκθεση με επάλειψη του δέρματος μπορεί να επιλεγεί για την απομίμηση μιας κύριας οδού ανθρώπινης έκθεσης και σαν πρότυπο σύστημα για την πρόκληση βλαβών του δέρματος.

Δοκιμασίες τοξικότητας ουσιών με λήψη με την εισπνοή

Επειδή οι μελέτες με λήψη της ουσίας με την εισπνοή παρουσιάζουν πιο περίπλοκα τεχνικά προβλήματα απ' ό,τι οι άλλες οδοί λήψης, δίδονται εδώ λεπτομερέστερες οδηγίες γι' αυτόν τον τρόπο λήψης. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική λύση σε ιδιαίτερες περιπτώσεις.

Οι μακροπρόθεσμες εκθέσεις σχεδιάζονται συνήθως με βάση υφιστάμενη προοπτική ανθρώπινης έκθεσης, εκθέτοντας τα ζώα καθημερινά επί έξι ώρες, μετά από την εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου, επί πέντε ημέρες την εβδομάδα (διαλείπουσα έκθεση) ή, σε ενδεχόμενη έκθεση περιβάλλοντος, 22 έως 24 ώρες έκθεσης κάθε ημέρα επί επτά ημέρες την εβδομάδα (συνεχής έκθεση), με μία ώρα περίπου την ημέρα για διατροφή των ζώων σε παραπλήσια ώρα και για συντήρηση των θαλάμων. Και στις δύο περιπτώσεις τα ζώα εκτίθενται συνήθως σε καθορισμένη συγκέντρωση δοκιμαζόμενων ουσιών.

Μια βασική διαφορά που πρέπει να ληφθεί υπόψη μεταξύ διαλείπουσας και συνεχούς έκθεσης είναι ότι στην πρώτη υπάρχει μια δικαεπτάωρη μέχρι δεκαοκτάωρη περίοδος κατά την οποία τα ζώα μπορεί να αναλάβουν από τις επιδράσεις της κάθε καθημερινής έκθεσης καθώς επίσης και μία ακόμη μεγαλύτερη περίοδος ανάληψης κατά τα σαββατοκύριακα.

Η επιλογή της διαλείπουσας ή συνεχούς έκθεσης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και από τις συνθήκες της ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία τις οποίες πρέπει να απομιμηθεί. Παρ' όλα αυτά πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες τεχνικές δυσκολίες. Επί παραδείγματι, τα πλεονεκτήματα της συνεχούς έκθεσης για την απομίμηση συνθηκών περιβάλλοντος μπορεί να αντισταθμιστούν από την ανάγκη χορήγησης νερού και τροφής κατά τη διάρκεια της έκθεσης και από την ανάγκη περισσότερο περίπλοκων (και αξιόπιστων) τεχνικών παραγωγής και παρακολούθησης αεροζόλ και ατμών.

Θάλαμοι έκθεσης

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται σε θαλάμους εισπνοής που είναι σχεδιασμένοι να υφίστανται δυναμική ροή δώδεκα τουλάχιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης στην ουσία. Οι θάλαμοι μάρτυρες και θάλαμοι έκθεσης πρέπει να είναι τελείως όμοιοι στην κατασκευή και στη σχεδίαση ώστε να εξασφαλίζουν συγκρίσιμες συνθήκες έκθεσης απ' όλες τις απόψεις, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Μια ελαφρή αρνητική πίεση μέσα στο θάλαμο

διατηρείται συνήθως για την πρόληψη διαρροής της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γύρω χώρο. Οι θάλαμοι πρέπει να ελαχιστοποιούν το συνωστισμό των πειραματόζωων. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας του θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του όγκου του θαλάμου.

Πρέπει να διενεργούνται οι παρακάτω μετρήσεις ή έλεγχοι:

i) Ροή αέρα: η ταχύτητα ροής του αέρα διά μέσου του θαλάμου πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς.

ii) Συγκέντρωση: κατά τη διάρκεια της περιόδου καθημερινής έκθεσης η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 15% της μέσης τιμής. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης αυτής, οι καθημερινές συγκεντρώσεις πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατό σταθερές.

iii) Θερμοκρασία και υγρασία: για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 2 °C και η υγρασία μέσα στο θάλαμο σε 30 έως 70%, εκτός από τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται νερό για την εναιώρηση της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα του θαλάμου. Κατά προτίμηση, τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται συνεχώς.

iv) Μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων: στην ατμόσφαιρα του θαλάμου πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα υγρά ή στερεά αεροζόλ. Τα σωματίδια αεροζόλ πρέπει να είναι αναπνεύσιμου μεγέθους για το χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο. Δείγματα ατμόσφαιρας θαλάμου πρέπει να λαμβάνονται στη ζώνη αναπνοής των ζώων. Το δείγμα αέρα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της κατανομής των σωματιδίων στα οποία εκτίθενται τα ζώα και πρέπει να αντιπροσωπεύει, επί σταθμικής βάσης, όλο το εναιωρούμενο αεροζόλ, ακόμη και όταν μεγάλη ποσότητα από τα αεροζόλ δεν είναι αναπνεύσιμη. Οι αναλύσεις μεγέθους πρέπει να διεξάγονται συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του αεροζόλ, και μετέπειτα, κατά τη διάρκεια των εκθέσεων, μόνον εφόσον παρίσταται ανάγκη, για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή σωματιδίων στα οποία εκτέθηκαν τα ζώα.

Διάρκεια της μελέτης

Η διάρκεια ενός πειράματος καρκινογενετικότητας καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της κανονικής διάρκειας ζωής των πειραματόζωων. Η μελέτη πρέπει να τερματίζεται στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρικητούς και στους 24 μήνες για τους αρουραίους. Ωστόσο, για ορισμένες ποικιλίες ζώων με μεγαλύτερη μακροβιότητα ή/και χαμηλό βαθμό αυτογενών όγκων, η μελέτη πρέπει να τελειώνει στους 24 μήνες για τους ποντικούς και τους κρικητούς και στους 30 μήνες για τους αρουραίους. Εναλλακτικά, ο τερματισμός μιας τέτοιας εκτεταμένης μελέτης είναι αποδεκτός όταν ο αριθμός των επιζώντων στην ομάδα της χαμηλότερης δόσης ή στην ομάδα μάρτυρα φθάνει το 25%. Όταν τελειώσει μια μελέτη στην οποία υπάρχει φανερή διαφορά αντίδρασης ανάμεσα στα δύο φύλα, κάθε φύλο πρέπει να θεωρηθεί σαν αντικείμενο χωριστής μελέτης. Στην περίπτωση που μόνο η ομάδα υψηλής δόσης πεθάνει πρόωρα από προφανείς αιτίες τοξικότητας, το γεγονός αυτό δεν οδηγεί στην περάτωση της μελέτης, αρκεί οι τοξικολογικές εκδηλώσεις να μην προκαλούν προβλήματα στις άλλες ομάδες. Για να γίνει αποδεκτό ένα αρνητικό πειραματικό αποτέλεσμα, δεν πρέπει να έχουν χαθεί από τη δοκιμασία πάνω από 10% των μελών οποιασδήποτε ομάδας λόγω αυτόλυσης των ιστών, κανιβαλισμού ή προβλημάτων διαχείρισης, ενώ τα επιζώντα ζώα απ' όλες τις ομάδες να μην είναι λιγότερα από το 50% στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρικητούς και στους 24 μήνες για τους αρουραίους.

Διαδικασία

Παρατηρήσεις

Οι καθημερινές παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στην σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απωλείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες, όπως ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Εφόσον παρατηρούναι ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Πρέπει να καταγράφονται οι κλινικές ενδείξεις και η θνησιμότητα για όλα τα ζώα. Ειδική προσοχή πρέπει να δοθεί στην ανάπτυξη όγκων. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος προσβολής, το σημείο προσβολής, οι διαστάσεις, η εμφάνιση και η εξέλιξη κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου.

Πρέπει να γίνονται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (και την κατανάλωση νερού όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό) κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της μελέτης και μετέπειτα κατά τρίμηνα περίπου διαστήματα εκτός εάν οι μεταβολές στην κατάσταση της υγείας ή στο βάρος του σώματος υπαγορεύουν τη λήψη άλλων μέτρων.

Το βάρος του σώματος πρέπει να καταγράφεται χωριστά για όλα τα ζώα μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της περιόδου της δοκιμασίας και μετέπειτα μία φορά τουλάχιστον κάθε τέσσερις εβδομάδες.

Κλινικές εξετάσεις

Αιματολογική εξέταση

Εάν οι παρατηρήσεις «κλωβού» δείχνουν επιδείνωση της υγείας των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης, πρέπει να διενεργείται μέτρηση του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος των προσβληθέντων ζώων.

Στους 12 μήνες, 18 μήνες και πριν από τη θανάτωση, λαμβάνεται μια κηλίδα αίματος από όλα τα ζώα. Η μέτρηση του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διενεργείται σε δείγματα ζώων της ομάδας υψηλότερης δόσης και των ομάδων μαρτύρων. Εάν τα στοιχεία αυτά, ιδιαίτερα εκείνα που λαμβάνονται πριν από τη θανάτωση, ή τα στοιχεία που προκύπτουν από την παθολογική εξέταση το υπαγορεύουν, τότε οι μετρήσεις του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διενεργούνται και για την επόμενη κατά σειρά ομάδα ή ομάδες χαμηλότερης δόσης.

Μακροσκοπική νεκροψία

Πρέπει να διενεργείται πλήρης μακροσκοπική νεκροψία σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που πέθαναν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή που θανατώθηκαν σε ετοιμοθάνατη κατάσταση. Όλοι οι μακροσκοπικά ορατοί όγκοι ή βλάβες που προκαλούν υποψία ότι αποτελούν όγκους, πρέπει να διατηρηθούν.

Τα παρακάτω όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν μέσα σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί, η τραχεία και οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, τα δέρμα, ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας, ο μαστικός αδένας θήλεος, το μυϊκό σύστημα των μηρών, το περιφερικό νεύρο, το στέρνο με μυελό οστών, το μηριαίο οστούν —συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας—, ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικό, μεσοθωρακικό και οσφυϊκό— και οι οφθαλμοί.

Η διόγκωση των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης με στερεωτικό αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για τη διατήρηση των ιστών αυτών, η διόγκωση των πνευμόνων σε μελέτες εισπνοής είναι αναγκαία για κατάλληλη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε μελέτες στις οποίες η ουσία χορηγείται διά της εισπνοής ολόκληρη η αναπνευστική οδός πρέπει να διατηρηθεί, συμπεριλαμβανομένης της ρινικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί σε όλα τα όργανα και ιστούς όλων των ζώων που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και σε όλα τα ζώα στις ομάδες μάρτυρες και υψηλής δόσης.

β) Όλοι οι μακροσκοπικά ορατοί όγκοι ή οι βλάβες, που προκαλούν υποψία ότι είναι όγκοι πρέπει να υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση, σε όλες τις ομάδες.

γ) Εάν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασματικών βλαβών ανάμεσα στην ομάδα υψηλότερης δόσης και στην ομάδα μάρτυρα, πρέπει να διενεργηθεί ιστοπαθολογική εξέταση στο συγκεκριμένο αυτό όργανο ή ιστό και στις άλλες ομάδες.

δ) Εάν τα επιζώντα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης είναι αισθητά λιγότερα απ' ό,τι εκείνα της ομάδας μάρτυρα, τότε η επόμενη ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.

ε) Εάν υπάρχουν ενδείξεις στην ομάδα υψηλής δόσης για πρόκληση τοξικών ή άλλων επιδράσεων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν μια νεοπλασματική αντίδραση, τότε η επόμενη ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με μορφή πίνακα, παρουσιάζοντας για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν όγκους που διαπιστώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, το χρόνο διαπίστωσης και τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν να έχουν όγκους μετά από τη θανάτωση. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, στέλεχος, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα, κλπ.

— συνθήκες του πειράματος:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης:

περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε θάλαμο δοκιμασίας, εφόσον χρησιμοποιηθεί. Πρέπει επίσης να περιγραφεί ο εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, όπου χρειάζεται, της σταθερότητας συγκέντρωσης αεροζόλ ή μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία:

Τα δεδομένα αυτά πρέπει να συνοψισθούν με μορφή πίνακα και να παρουσιαστούν με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή διακύμανση), και πρέπει να περιλαμβάνουν:

α) ταχύτητες ροής του αέρα διαμέσου της συσκευής εισπνοής·

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα·

γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που εισάγεται στη συσκευή εισπνοής, διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα)·

δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε·

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στη ζώνη αναπνοής της δοκιμασίας·

ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— δεδομένα συχνότητας εμφάνισης όγκων ανά φύλο, δόση και τύπο όγκου,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Ο στόχος μιας συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας είναι να προσδιορίσει τις χρόνιες και καρκινογενετικές επιδράσεις μιας ουσίας πάνω σε ένα θηλαστικό είδος ζώου μετά από παρατεταμένη έκθεση. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, η μελέτη καρκινογενετικότητας υποβοηθείται από μία τουλάχιστον δορυφορική ομάδα αγωγής και μία δορυφορική ομάδα μάρτυρα. Η δόση που χρησιμοποιείται για τη δορυφορική ομάδα υψηλής δόσης μπορεί να είναι υψηλότερη από εκείνη που χρησιμοποιείται για την ομάδα υψηλής δόσης στη μελέτη καρκινογενετικότητας. Τα ζώα στη μελέτη καρκινογενετικότητας εξετάζονται για γενική τοξικότητα καθώς επίσης και για αντίδραση στην καρκινογένεση. Τα ζώα στη δορυφορική ομάδα αγωγής εξετάζονται για γενική τοξικότητα.

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται κανονικά επτά ημέρες την εβδομάδα, μέσω κατάλληλης οδού, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων (μία δόση ανά ομάδα), κατά το μεγαλύτερο μέρος της διάρκειας της ζωής τους. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία και έπειτα από αυτήν, τα πειραματόζωα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας και την ανάπτυξη όγκων.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται στις απαιτούμενες ομάδες αγωγής και μάρτυρες.

Πειραματόζωα

Το προτιμούμενο είδος είναι ο αρουραίος. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών που έχουν διεξαχθεί κατά το παρελθόν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη ζώων (τρωκτικά ή μη τρωκτικά). Πρέπει να χρησιμοποιούνται νέα υγιή ζώα από τα στελέχη που συνήθως χρησιμοποιούνται για εργαστηριακές μελέτες, και οι δόσεις πρέπει να αρχίζουν το συντομότερο δυνατόν μετά από τον απογαλακτισμό.

Στην αρχή της μελέτης η διαφορά βάρους μεταξύ των ζώων που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που έχει διεξαχθεί μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική σε μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και για τις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν 100 τουλάχιστον ζώα (50 θηλυκά και 50 αρσενικά) σε κάθε επίπεδο δόσης και συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν έχουν προγραμματιστεί θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης.

Η δορυφορική ομάδα ή ομάδες αγωγής για την εκτίμηση των παθολογικών επιδράσεων, εκτός των όγκων, πρέπει να περιλαμβάνουν 20 ζώα από κάθε φύλο, ενώ η δορυφορική ομάδα μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει 10 ζώα από κάθε φύλο.

Επίπεδα δόσεων

Για τους σκοπούς της δοκιμασίας καρκινογενετικότητας, εκτός από τη συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλό για να προκαλέσει σημεία ελάχιστης τοξικότητας, όπως είναι η ελαφρή ύφεση στην απόκτηση βάρους του σώματος (λιγότερο από 10%), χωρίς να μεταβάλει αισθητά την κανονική διάρκεια ζωής λόγω επιδράσεων που δεν σχετίζονται με όγκους.

Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί επιπλοκές στην κανονική ανάπτυξη, εξέλιξη και μακροβιότητα του ζώου ή να παράγει οποιαδήποτε ένδειξη τοξικότητας. Γενικά, δεν πρέπει να είναι χαμηλότερη από 10% από την υψηλή δόση.

Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να ορισθούν σε ένα μέσο επίπεδο μεταξύ των υψηλής και χαμηλής δόσης.

Κατά την επιλογή των επιπέδων δόσεων, πρέπει να ληφθούν υπόψη δεδομένα από προηγούμενο και μελέτες τοξικότητας.

Για τους σκοπούς της δοκιμασίας της χρόνιας τοξικότητας συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη πρόσθετες ομάδες αγωγής και μία συμπράττουσα δορυφορική ομάδα μάρτυρας. Η υψηλή δόση για τα ζώα της δορυφορικής ομάδας που υφίστανται την αγωγή πρέπει να επιλεγεί κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί σαφή τοξικότητα.

Η συχνότητα έκθεσης είναι κανονικά καθημερινή. Εάν η χημική ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό ή αναμειγνύεται στο διαιτολόγιο πρέπει να είναι συνεχώς διαθέσιμη.

Ομάδες μάρτυρες

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια συμπράττουσα ομάδα, τελείως όμοια από κάθε άποψη με τις εκτιθέμενες ομάδες, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία.

Σε ειδικές περιστάσεις, όπως είναι οι μελέτες τοξικότητας, στις οποίες η ουσία λαμβάνεται με την εισπνοή και αφορά αεροζόλ ή τη χρήση γαλακτοματοποιητικού μέσου μη χαρακτηρισμένης βιολογικής δράσης σε μελέτες τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το στόμα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια πρόσθετη ομάδα μάρτυρας που δεν θα εκτίθεται στο έκδοχο.

Οδός λήψης

Οι τρεις κύριες οδοί λήψης είναι από το στόμα, από το δέρμα και με την εισπνοή. Η επιλογή της οδού λήψης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της δοκιμαζόμενης ουσίας και από την πιθανή μορφή της έκθεσης του ανθρώπου σ' αυτήν.

Μελέτες τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το στόμα

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό, και εφόσον η στοματική οδός είναι μία από τις οδούς από την οποία μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι, τότε χρησιμοποιείται αυτή, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις. Τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία στη δίαιτά τους, διαλυμένη σε πόσιμο νερό, ή μέσα σε κάψουλες.

Στην ιδανικότερη περίπτωση οι δόσεις χορηγούνται επί επτά ημέρες την εβδομάδα, επειδή η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα επιτρέπει την ανάληψη από την τοξικότητα ή την υποχώρησή της κατά την περίοδο που δεν χορηγούνται δόσεις, και έτσι επηρεάζει το αποτέλεσμα και τη μετέπειτα αξιολόγηση. Ωστόσο, από πρακτική κυρίως άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα θεωρείται σαν αποδεκτή.

Δοκιμασίες τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το δέρμα

Η δερματική έκθεση με την επάλειψη του δέρματος μπορεί να επιλεγεί για την απομίμηση μιας κύριας οδού ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία και σαν ένα πρότυπο σύστημα για την πρόκληση βλαβών στο δέρμα.

Δοκιμασίες τοξικότητας με λήψη της ουσίας με την εισπνοή

Επειδή οι μελέτες αυτές παρουσιάζουν πιο περίπλοκα τεχνικά προβλήματα απ' ό,τι οι μελέτες με άλλες οδούς χορήγησης, δίδονται εδώ λεπτομερέστερες οδηγίες γι' αυτόν τον τρόπο χορήγησης. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική λύση σε ιδιαίτερες καταστάσεις.

Οι μακροπρόθεσμες εκθέσεις σχεδιάζοντας συνήθως με βάση υφιστάμενη προοπτική ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία, εκθέτοντας τα ζώα καθημερινά επί έξι ώρες, μετά από την εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου, επί πέντε ημέρες την εβδομάδα (διαλείπουσα έκθεση), ή, σε ενδεχόμενη έκθεση περιβάλλοντος, 22 έως 24 ώρες έκθεσης κάθε ημέρα επί επτά ημέρες την εβδομάδα (συνεχής έκθεση), με μία ώρα περίπου την ημέρα για τη διατροφή των ζώων σε παραπλήσια ώρα και για συντήρηση του θαλάμου. Και στις δύο περιπτώσεις τα ζώα εκτίθενται συνήθως σε καθορισμένη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας. Μια βασική διαφορά που πρέπει να ληφθεί υπόψη μεταξύ διαλείπουσας και συνεχούς έκθεσης είναι ότι στην πρώτη υπάρχει μια δεκαεπτάωρη μέχρι δεκαοκτάωρη περίοδος κατά την οποία τα ζώα μπορεί να αναλάβουν από τις επιδράσεις της κάθε καθημερινής έκθεσης καθώς επίσης και μία ακόμη μεγαλύτερη περίοδος ανάληψης κατά τα σαββατοκύριακα.

Η επιλογή της διαλείπουσας ή της συνεχούς έκθεσης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και από την ανθρώπινη έκθεση στην ουσία που πρέπει να απομιμηθεί. Παρ' όλα αυτά πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες τεχνικές δυσκολίες. Επί παραδείγματι, τα πλεονεκτήματα της συνεχούς έκθεσης για την απομίμηση συνθηκών περιβάλλοντος μπορεί να αντισταθμιστούν από την ανάγκη χορήγησης νερού και τροφής κατά τη διάρκεια της έκθεσης και από την ανάγκη περισσότερο περίπλοκων (και αξιόπιστων) τεχνικών παραγωγής και συνεχούς παρακολούθησης με μέτρηση αεροζόλ και ατμών.

Θάλαμοι έκθεσης

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται σε θαλάμους εισπνοής που είναι σχεδιασμένοι να υφίστανται δυναμική ροή δώδεκα τουλάχιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα ώστε να διασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης στην ουσία. Οι θάλαμοι μάρτυρες και έκθεσης πρέπει να είναι τελείως όμοιοι στην κατασκευή και στη σχεδίαση ώστε να εξασφαλίζουν συνθήκες έκθεσης συγκρίσιμες απ' όλες τις απόψεις, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Μια ελαφρή αρνητική πίεση μέσα στο θάλαμο διατηρείται συνήθως για την πρόληψη διαρροής της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γύρο χώρο. Οι θάλαμοι πρέπει να ελαχιστοποιούν το συνωστισμό των πειραματόζωων. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας του θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου.

Πρέπει να διενεργούνται οι παρακάτω μετρήσεις ή έλεγχοι:

i) Ροή αέρα: η ταχύτητα ροής του αέρα διά μέσου του θαλάμου πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς.

ii) Συγκέντρωση: κατά τη διάρκεια της περιόδου της καθημερινής έκθεσης, η συγκέντρωση δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 15 % από τη μέση τιμή. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, οι καθημερινές συγκεντρώσεις πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατό σταθερές.

iii) Θερμοκρασία και υγρασία: για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 2 °C και η υγρασία μέσα στο θάλαμο σε 30 έως 70 %, εκτός από τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται νερό για την εναιώρηση της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα του θαλάμου. Κατά προτίμηση, τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται και να μετρώνται συνεχώς.

iv) Μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων: στην ατμόσφαιρα του θαλάμου πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα υγρά ή στερεά αεροζόλ. Τα σωματίδια αεροζόλ πρέπει να είναι αναπνεύσιμου μεγέθους για το χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο. Δείγματα ατμόσφαιρας θαλάμου πρέπει να λαμβάνονται στη ζώνη αναπνοής των ζώων. Το δείγμα αέρα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της κατανομής των σωματιδίων στα οποία εκτίθενται τα ζώα και πρέπει να αντιπροσωπεύει, επί σταθμικής βάσης, όλο το εναιωρούμενο αεροζόλ, ακόμη και όταν μεγάλη ποσότητα από το αεροζόλ δεν είναι αναπνεύσιμη. Οι αναλύσεις μεγέθους πρέπει να διεξάγονται συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής σωματιδίων ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του αεροζόλ, και μετέπειτα, κατά τη διάρκεια των εκθέσεων, μόνον εφόσον παρίσταται ανάγκη, για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή σωματιδίων στα οποία εκτέθηκαν τα ζώα.

Διάρκεια της μελέτης

Η διάρκεια μιας μελέτης καρκινογενετικότητας καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της κανονικής διάρκειας ζωής των πειραματόζωων. Η μελέτη πρέπει να τερματίζεται στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρικητούς και στους 24 μήνες για τους αρουραίους. Ωστόσο, για ορισμένα στελέχη ζώων με μεγαλύτερη μακροβιότητα ή/και χαμηλό βαθμό αυτογενών όγκων, η μελέτη πρέπει να ολοκληρώνεται στους 24 μήνες για τους ποντικούς και τους κρικητούς και στους 30 μήνες για τους αρουραίους. Εναλλακτικά, η περάτωση μιας τέτοιας εκτεταμένης μελέτης είναι αποδεκτή όταν ο αριθμός των επιζώντων ζώων στην ομάδα χαμηλότερης δόσης ή στην ομάδα μάρτυρα φθάνει το 25 %. Όταν τελειώσει μια μελέτη στην οποία υπάρχη έκδηλη διαφορά αντίδρασης κατά φύλο, κάθε φύλο πρέπει να θεωρηθεί σαν αντικείμενο χωριστής μελέτης. Στην περίπτωση που μόνο η ομάδα υψηλής δόσης πεθαίνει πρόωρα από προφανείς αιτίες τοξικότητας, δεν χρειάζεται να περατωθεί η μελέτη, υπό την προϋπόθεση ότι οι τοξικολογικές εκδηλώσεις δεν προκαλούν προβλήματα στις άλλες ομάδες. Για να γίνει αποδεκτό ένα αρνητικό πειραματικό αποτέλεσμα, δεν πρέπει να χαθούν από τη δοκιμασία πάνω από 10 % των μελών οποιασδήποτε ομάδας λόγω αυτόλυσης των ιστών, κανιβαλισμού ή προβλημάτων διαχείρισης, και τα επιζώντα ζώα απ' όλες τις ομάδες να μην είναι λιγότερα από το 50 % στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρικητούς, και στους 24 μήνες για τους αρουραίους.

Οι δορυφορικές ομάδες 20 ζώων ανά φύλο που λαμβάνουν δόσεις και τα 10 ζώα μάρτυρες ανά φύλο για τη δοκιμασία χρόνιας τοξικότητας πρέπει να διατηρηθούν στη μελέτη για δώδεκα τουλάχιστον μήνες. Τα ζώα αυτά πρέπει να προγραμματισθούν για θανάτωση, για την εξέταση της παθολογικής κατάστασης σχετικά με τη δοκιμαζόμενη ουσία, στην οποία παθολογική κατάσταση, δεν εμπλέκονται γηριατρικές μεταβολές.

Διαδικασία

Παρατηρήσεις

Πρέπει να διενεργούνται καθημερινές παρατηρήσεις «κλωβού» που πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς.

Πρέπει να διενεργείται κλινική εξέταση σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα στα ζώα της δορυφορικής ομάδας (ομάδων) που υφίστανται την αγωγή.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απωλείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως είναι ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Εφόσον παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Πρέπει να καταγράφονται οι κλινικές ενδείξεις, συμπεριλαμβανομένων των νευρολογικών και οφθαλμολογικών μεταβολών, καθώς επίσης και η θνησιμότητα για όλα τα ζώα. Ειδική προσοχή πρέπει να δοθεί στην ανάπτυξη όγκων. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος προσβολής, το σημείο προσβολής, οι διαστάσεις, η εμφάνιση και η εξέλιξη κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος εμφάνισης και εξέλιξης των τοξικών συνθηκών.

Πρέπει να γίνονται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (και την κατανάλωση νερού όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό) κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της μελέτης και μετέπειτα κατά τρίμηνα περίπου διαστήματα εκτός αν η κατάσταση της υγείας ή οι μεταβολές στο βάρος του σώματος υπαγορεύουν τη λήψη άλλων μέτρων.

Το βάρος του σώματος πρέπει να καταγράφεται χωριστά για όλα τα ζώα μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της περιόδου της δοκιμασίας και μετέπειτα μία φορά τουλάχιστον κάθε τέσσερις εβδομάδες.

Κλινικές εξετάσεις

Αιματολογική εξέταση

Αιματολογική εξέταση (π.χ. περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη, όγκος συσσωρευμένων κυττάρων, συνολικός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιματοπετάλια ή άλλες μετρήσεις της πηκτικής ικανότητας του αίματος) πρέπει να διενεργείται στους τρεις μήνες, έξι μήνες, και μετέπειτα κατά διαστήματα έξι περίπου μηνών καθώς επίσης και κατά το τέλος της δοκιμασίας σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες. Εάν είναι δυνατόν, οι αιμοληψίες πρέπει να γίνουν στους ίδιους αρουραίους σε κάθε ένα από τα παραπάνω αναφερθέντα χρονικά διαστήματα.

Εάν οι παρατηρήσεις «κλωβού» δείχνουν επιδείνωση της υγείας των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης, πρέπει να διενεργηθεί διαφορική μέτρηση του αίματος των προσβληθέντων ζώων. Η διαφορική μέτρηση του αίματος διενεργείται στα δείγματα των ζώων εκείνων που ανήκουν στην ομάδα υψηλότερης δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Οι διαφορικές μετρήσεις αίματος διενεργούνται για την επόμενη κατά σειρά ομάδα ή ομάδες χαμηλότερης δόσης, μόνον εάν υπάρχει βασική διαφορά μεταξύ της ομάδας υψηλότερης δόσης και των ομάδων ελέγχου ή εάν ενδείκνυται από τα παθολογικά ευρήματα.

Ανάλυση ούρων

Δείγματα ούρων από 10 αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες (εάν είναι δυνατό από τους ίδιους αρουραίους και κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω στις αιματολογικές εξετάσεις), θα πρέπει να συγκεντρώνονται για ανάλυση. Οι παρακάτω προσδιορισμοί πρέπει να γίνονται είτε σε μεμονωμένα ζώα είτε σε συγχωνευμένο δείγμα ανά φύλο ανά ομάδα τρωκτικών:

— εμφάνιση: όγκος και πυκνότητα για τα μεμονωμένα ζώα,

— πρωτεΐνη, γλυκόζη, κετόνες, λανθάνουσα αιμορραγία (ημιποσοτικά), και

— μικροσκοπική εξέταση ιζήματος (ημιποσοτικά).

Κλινική χημική ανάλυση

Κατά διαστήματα έξι μηνών περίπου και στο τέλος της μελέτης, λαμβάνονται δείγματα αίματος για κλινικές χημικές μετρήσεις από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες (αν είναι δυνατόν, από τους ίδιους αρουραίους σε κάθε χρονικό διάστημα). Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί ένα προπειραματικό δείγμα από τα μη τρωκτικά. Παρασκευάζεται πλάσμα από τα δείγματα αυτά και γίνονται οι παρακάτω προσδιορισμοί:

— συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης,

— συγκέντρωση αλβουμίνης,

— δοκιμασίες λειτουργίας ήπατος (όπως είναι η δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, της γλουταμινικής πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης (¹) και της γλουταμινικής οξαλοξεικής τρανσαμινάσης (²) η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης,

— ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, όπως είναι ή νηστεία γλυκόζης αίματος,

— δοκιμασίες λειτουργίας νεφρού, όπως είναι το άζωτο ουρίας του αίματος.

(¹) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης στον ορό.
(²) Γνωστή τώρα σαν ασπαρτική αμινοτρανσφεράση στον ορό.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία, που θα περιλαμβάνει και εκείνα που πέθαναν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή εκείνα που θανατώθηκαν σε ετοιμοθάνατη κατάσταση. Πριν από τη θανάτωση όλων των ζώων, πρέπει να ληφθούν δείγματα αίματος από όλα τα ζώα για διαφορικού τύπου μέτρηση του αίματος. Όλες οι μακροσκοπικά ορατές βλάβες, οι όγκοι ή οι βλάβες που προκαλούν υποψία όγκων, πρέπει να διατηρηθούν. Θα πρέπει να γίνει προσπάθεια για τη συσχέτιση των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

Όλα τα όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν για ιστοπαθολογική εξέταση. Αυτή συνήθως αφορά τα παρακάτω όργανα και ιστούς: τον εγκέφαλο (μυελό/γέφυρα, παρεγκεφαλικό και εγκεφαλικό φλοιό), την υπόφυση, το θυρεοειδή (συμπεριλαμβανομένου του παραθυρεοειδούς), το θύμο, τους πνεύμονες (συμπεριλαμβανομένης της τραχείας), την αορτή, τους σιελογόνους αδένες, το ήπαρ, τη σπλήνα, τους νεφρούς ([1]), τα επινεφρίδια ([1]), τον οισοφάγο, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τη νηστίδα, τον ειλεό, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, τη μήτρα, την ουροδόχο κύστη, τους λεμφαδένες, το πάγκρεας, τους γεννητικούς αδένες ([1]), τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, το μαστικό αδένα θήλεος ([1]), το δέρμα, το μυϊκό σύστημα, το περιφερικό νεύρο, το νωτιαίο μυελό (αυχενικό, μεσοθωρακικό και οσφυϊκό), το στέρνο με μυελό οστών και το μηριαίον οστούν (συμπεριλαμβανομένης της άρθρωσης) και τους οφθαλμούς.

Παρ' όλο ότι η διόγκωση των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης με μία σταθεροποιητική ουσία αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για τη διατήρηση των ιστών αυτών, η διόγκωση των πνευμόνων σε μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή είναι απαραίτητη για κατάλληλη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε ειδικές μελέτες, όπως είναι οι μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή, ολόκληρη η αναπνευστική οδός πρέπει να μελετηθεί, συμπεριλαμβανομένης της ρινός, του φάρυγγα και του λάρυγγα.

Εάν διεξαχθούν άλλες κλινικές εξετάσεις, οι πληροφορίες που θα ληφθούν από τις διαδικασίες αυτές πρέπει να είναι διαθέσιμες πριν από τη μικροσκοπική εξέταση, επειδή μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό μέσο καθοδήγησης για τον παθολόγο.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Για το τμήμα της δοκιμασίας που αφορά τη χρόνια τοξικότητα:

Πρέπει να διενεργηθεί λεπτομερής εξέταση όλων των διατηρημένων οργάνων όλων των ζώων της δορυφορικής ομάδας υψηλής δόσης και των ομάδων μαρτύρων. Όπου βρεθεί παθολογική επίδραση στη δορυφορική ομάδα υψηλής δόσης που έχει σχέση με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των ζώων σε όλες τις δορυφορικές ομάδες αγωγής πρέπει να υποβληθούν σε πλήρη λεπτομερή ιστολογική εξέταση, καθώς επίσης και εκείνα των ομάδων αγωγής, στο τμήμα εκείνο της μελέτης που αφορά την καρκινογενετικότητα, κατά την περάτωσή της.

Για το τμήμα της δοκιμασίας που αφορά την καρκινογένεση:

α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί σε όλα τα όργανα και ιστούς όλων των ζώων που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και σε όλα τα ζώα στις ομάδες μάρτυρες και υψηλής δόσης.

β) Όλοι οι μακροσκοπικά ορατοί όγκοι ή βλάβες σε οποιοδήποτε όργανο, που προκαλούν υποψία ότι είναι όγκοι σε όλες τις ομάδες, πρέπει να εξετασθούν.

γ) Εάν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασματικών βλαβών ανάμεσα στην ομάδα υψηλότερης δόσης και στην ομάδα μάρτυρα, πρέπει να διεξαχθεί ιστοπαθολογική εξέταση στο συγκεκριμένο όργανο ή ιστό και στις άλλες ομάδες.

δ) Εάν τα επιζώντα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης είναι αισθητά λιγότερα από εκείνα της ομάδας μάρτυρα, τότε η επόμενη κατά σειρά ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.

ε) Εάν υπάρχουν ενδείξεις στην ομάδα υψηλής δόσης για επαγωγή τοξικών ή άλλων επιδράσεων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν μια νεοπλασματική αντίδραση, η επόμενη κατά σειρά ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, παρουσιάζοντας για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν όγκους ή τοξικές επιδράσεις που διαπιστώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, το χρόνο διαπίστωσης και τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν να έχουν όγκους μετά τη θανάτωση. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, στέλεχος, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, δίαιτα κλπ.,

[1] Τα όργανα αυτά, από δέκα ζώα ανά φύλο ανά ομάδα για τα τρωκτικά, θα πρέπει να ζυγιστούν.

— συνθήκες του πειράματος:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης:

Περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε θάλαμο δοκιμασίας, εφόσον χρησιμοποιηθεί. Πρέπει επίσης να περιγραφεί ο εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, εφόσον χρειάζεται, της σταθερότητας της συγκέντρωσης αεροζόλ ή μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία:

Τα δεδομένα αυτά πρέπει να συνοψισθούν με μορφή πίνακα και να παρουσιαστούν με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή διακύμανση), και πρέπει να περιλαμβάνουν:

α) ταχύτητες ροής του αέρα διαμέσου της συσκευής εισπνοής·

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα·

γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που τροφοδοτείται στη συσκευή εισπνοής, διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα·

δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε·

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στη ζώνη αναπνοής της δοκιμασίας·

ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,

— συχνότητα εμφάνισης όγκων ανά φύλο, δόση και τύπο όγκου,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης (συμπεριλαμβανομένης και της δορυφορικής ομάδας),

— στοιχεία τοξικών αντιδράσεων ανά φύλο και δόση,

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,

— χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— οφθαλμολογικά ευρήματα,

— στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,

— αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων,

— αποτελέσματα κλινικών βιοχημικών εξετάσεων (συμπεριλαμβανομένης τυχόν ανάλυσης ούρων),

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε κλιμακωτά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ζώων. Τα αρσενικά πρέπει να λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και για ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο περίπου (56 ημέρες για τον ποντικό και 70 ημέρες για τον αρουραίο), έτσι ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στη σπερματογένεση από τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Τα θηλυκά της γενεάς Γ (Γ = γονείς) πρέπει να λαμβάνουν δόσεις επί δύο τουλάχιστον πλήρεις κύκλους οργασμού ώστε να προκληθούν επιπλοκές στον οργασμό από τη δοκιμαζόμενη ουσία. Κατόπιν, τα ζώα ζευγαρώνονται. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου του ζευγαρώματος και μετέπειτα μόνο στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και κατά τη διάρκεια της περιόδου της γαλουχίας.

Για τη λήψη της ουσίας με την εισπνοή, η μέθοδος αυτή θα απαιτήσει τροποποιήσεις.

1.5. Ποιοτικά κριτήρια

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Πριν από δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα πλήρους ανάπτυξης ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από το πείραμα.

Συνιστάται η δοκιμαζόμενη ουσία να χορηγείται μέσα στη δίαιτα ή στο πόσιμο νερό. Άλλες οδοί λήψης είναι επίσης αποδεκτές. Όλα τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν τις δόσεις τους με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια της σχετικής περιόδου του πειράματος. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα πρόσθετα για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Η χορήγηση δόσεων θα γίνεται επί επτά ημέρες την εβδομάδα.

Πειραματόζωα

Επιλογή του είδους

Ο αρουραίος ή ο ποντικός ειναι το προτιμώμενο είδος. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται είδη ζώων με χαμηλή γονιμότητα παρά μόνο υγιή ζώα που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειραματικές διαδικασίες. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, στέλεχος, φύλο, βάρος ή/και ηλικία.

Για μια επαρκή εκτίμηση της γονιμότητας, πρέπει να μελετηθούν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά. Όλα τα ζώα που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και τα ζώα μάρτυρες, πρέπει να απογαλακτισθούν πριν από την έναρξη χορήγησης των δόσεων.

Αριθμός και φύλο

Κάθε ομάδα ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και των ζώων μαρτύρων πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ζώων που να αποδίδει 20 περίπου έγκυα θηλυκά σε περίοδο τοκετού ή που να μην απέχουν πολύ από την περίοδο αυτή. Αυτό έχει σαν σκοπό να δημιουργηθούν αρκετές εγκυμοσύνες και απόγονοι για την εξασφάλιση μιας ουσιαστικής αξιολόγησης της ικανότητας της ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην εγκυμοσύνη και στη μητρική συμπεριφορά στα ζώα της γενεάς Γ, καθώς επίσης και στον θηλασμό, στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των απογόνων (Α 1) (Α 1 = απόγονοι πρώτης γενεάς) από τη σύλληψη ως τον απογαλακτισμό.

Συνθήκες δοκιμασίας

Η τροφή και το νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Όταν πλησιάζει η περίοδος του τοκετού, τα έγκυα θηλυκά πρέπει να τοποθετούνται χωριστά σε ειδικά κλουβιά τοκετού, και μπορούν να τους παρέχονται υλικά κατασκευής φωλιάς.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, η ομάδα μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει το έκδοχο στην ποσότητα που χρησιμοποιείται στο υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εάν μια δοκιμαζόμενη ουσία προκαλεί μειωμένη διαιτητική λήψη ή χρήση, τότε πιθανό να θεωρηθεί αναγκαία η χρησιμοποίηση μιας ομάδας μάρτυρα διατροφής κατά ζεύγη. Το καλύτερο είναι, εάν το υψηλότερο επίπεδο δόσης δεν περιορίστεί από τη φυσικοχημική φύση ή τις βιολογικές επιδράσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας, να προκαλεί τοξικότητα αλλά όχι θνησιμότητα στους γονείς (Γ). Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να προκαλούν ελάχιστες τοξικές επιδράσεις, που να μπορούν να αποδοθούν στην δοκιμαζόμενη ουσία, και η χαμηλή δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί οποιεσδήποτε παρατηρήσιμες επιπλοκές στους γονείς ή στους απογόνους. Όταν χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή κάψουλα, η δόση κάθε ζώου πρέπει να βασίζεται στο ιδιαίτερο βάρος του σώματος κάθε ζώου και να προσαρμόζεται κάθε εβδομάδα ανάλογα με τις μεταβολές του βάρους του σώματος. Για τα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι δόσεις μπορούν να βασίζονται στο βάρος του σώματος κατά την ημέρα 0 ή 6 της εγκυμοσύνης, εφόσον αυτό είναι επιθυμητό.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσίας χαμηλής τοξικότητας, εάν ένα επίπεδο δόσης 1000 mg/kg τουλάχιστον δεν παράγει οποιαδήποτε ένδειξη επιπλοκής στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες. Εάν μία προκαταρκτική μελέτη σε υψηλό επίπεδο δόσης, με σαφείς ενδείξεις μητρικής τοξικότητας, δεν παρουσιάζει επιπλοκές στη γονιμότητα, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες.

Εκτέλεση της δοκιμασίας

Πειραματικά προγράμματα

Η καθημερινή χορήγηση δόσης στους αρσενικούς γονείς (Γ) πρέπει να αρχίσει όταν έχουν ηλικία πέντε έως εννέα εβδομάδων περίπου, αφού ήδη έχουν απογαλακτισθεί και εγκλιματισθεί επί πέντε τουλάχιστον ημέρες. Στους αρουραίους, η χορήγηση δόσεων συνεχίζεται επί δέκα εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος (για τους ποντικούς οκτώ εβδομάδες). Τα αρσενικά θα πρέπει να θανατωθούν και να εξετασθούν είτε στο τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος ή, εναλλακτικά, μπορούν να διατηρηθούν με πειραματική δίαιτα για την ενδεχόμενη παραγωγή δεύτερης ομάδας νεογνών και να θανατωθούν και να εξετασθούν σε κάποιο χρονικό σημείο πριν από το τέλος της μελέτης. Για τους θηλυκούς γονείς (Γ), η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει πέντε ημέρες τουλάχιστον μετά τον εγκλιματισμό, και να συνεχίζεται επί δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από το ζευγάρωμα. Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στα θηλυκά (Γ) πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη την περίοδο ζευγαρώματος των τριών εβδομάδων, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των απογόνων (Α1). Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι τροποποιήσεις του προγράμματος χορήγησης δόσεων με βάση άλλες διαθέσιμες πληροφορίες για τη δοκιμαζόμενη ουσία, όπως είναι η επαγωγή μεταβολισμού ή βιοσυσσώρευσης.

Διαδικασία ζευγαρώματος

Στις μελέτες τοξικότητας αναπαραγωγής μπορούν να εφαρμοσθούν είτε ζευγαρώματα τύπου 1/1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό) ή 1/2 (ένα αρσενικό προς δύο θηλυκά).

Με βάση τον τύπο ζευγαρώματος 1/1, ένα θηλυκό πρέπει να τοποθετηθεί με το ίδιο αρσενικό μέχρι ότου επέλθει η εγκυμοσύνη ή μέχρις ότου περάσουν τρεις εβδομάδες. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή βύσματος από πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Η ημέρα 0 της εγκυμοσύνης ορίζεται, λαμβανομένης υπόψη της σπερματογένεσης, σαν ημέρα της ανεύρεσης πηγμένου σπέρματος ή σπέρματος.

Τα ζευγάρια εκείνα που δεν ζευγαρώνουν, πρέπει να εξετασθούν για να προσδιορισθεί η αιτία της φαινομενικής στειρότητας. Στην έρευνα αυτή περιλαμβάνονται διαδικασίες, όπως είναι η παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλους αποδεδειγμένους πατέρες ή μητέρες, η μικροσκοπική εξέταση των αναπαραγωγικών οργάνων και η εξέταση του κύκλου οργασμού ή της σπερματογένεσης.

Αριθμός νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα

Τα ζώα που λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης γονιμότητας επιτρέπεται να γεννήσουν κανονικά και να μεγαλώσουν τα παιδιά τους μέχρι το στάδιο του απογαλακτισμού χωρίς ιδιαίτερη προτυποποίηση των νεογνών.

Εάν ακολουθηθεί η προτυποποίηση, προτείνεται η παρακάτω διαδικασία:

Μεταξύ της πρώτης και της τέταρτης ημέρας μετά τη γέννηση, ο αριθμός των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα μπορεί να διορθωθεί με την αφαίρεση των πλεοναζόντων νεογνών με επιλογή, έτσι ώστε να δημιουργηθούν όσο το δυνατόν πλησιέστερα τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ανά ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα. Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την ύπαρξη τεσσάρων νεογνών ανά φύλο σε κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, είναι αποδεκτή η μερική διόρθωση (π.χ. 5 αρσενικά και 3 θηλυκά). Δεν γίνονται δεκτές διορθώσεις για ομάδες νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα και που περιλαμβάνουν λιγότερα από οκτώ νεογνά.

Παρατηρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμασίας, κάθε ζώο πρέπει να παρατηρείται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και όλα τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά το ζευγάρωμα, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται κάθε εβδομάδα. Μετά τον τοκετό, και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις κατανάλωσης τροφής καθώς επίσης και κατανάλωσης νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό, την ίδια ημέρα με τη ζύγιση των ομάδων νεογνών κάθε μητέρας. Οι αρσενικοί και θηλυκοί γονείς (Γ) θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης δόσεων και μετέπειτα κάθε εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται χωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

Η διάρκεια κυήσεως πρέπει να υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατόν μετά τη γέννηση για να βρεθεί ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, ο αριθμός των θνησιγενών, ο αριθμός των ζωντανών και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών.

Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώθηκαν την τέταρτη ημέρα πρέπει να διατηρηθούν και να μελετηθούν για ενδεχόμενα ελαττώματα. Τα ζωντανά νεογνά θα πρέπει να μετρηθούν και οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα να ζυγιστούν το επόμενο πρωί μετά τη γέννησή τους, καθώς επίσης την τέταρτη και έβδομη ημέρα, και μετέπειτα κάθε εβδομάδα μέχρι το τέλος της μελέτης, οπότε τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται χωριστά. Πρέπει να καταγράφονται οι φυσικές ανωμαλίες ή οι ανωμαλίες συμπεριφοράς που παρατηρούνται στις μητέρες ή στους απογόνους.

Παθολογική εξέταση

Νεκροψία

Κατά το χρόνο της θανάτωσης ή του θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ζώα της γενεάς Γ θα πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές, με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα νεογνά θα πρέπει να εξετάζονται για ελαττώματα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Οι ωοθήκες, η μήτρα, ο τράχηλος, ο κόλπος, οι όρχεις, η επιδιδυμίδα, η σπερματοδόχος κύστη, ο προστάτης, ο πηκτικός αδένας, η υπόφυση και τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των ζώων της γενεάς Γ, πρέπει να διατηρηθούν για μικροσκοπική εξέταση. Στη σπάνια περίπτωση που τα όργανα αυτά δεν έχουν εξετασθεί σε άλλες μελέτες πολλαπλών δόσεων, πρέπει να εξετασθούν μικροσκοπικά σε όλα τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης και ομάδας μάρτυρα και, εφόσον είναι δυνατόν, στα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα όργανα που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα ζώα αυτά πρέπει εν συνεχεία να εξετασθούν σε όλα τα ζώα της γενεάς Γ. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να γίνει μικροσκοπική εξέταση σε όλους τους ιστούς που παρουσιάζουν μακροσκοπικές παθολογικές μεταβολές. Όπως προτάθηκε στις διαδικασίες ζευγαρώματος, τα αναπαραγωγικά όργανα των ζώων που είναι ύποπτα στειρότητας, μπορεί να υποβληθούν σε μικροσκοπική εξέταση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα μπορούν να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των γόνιμων αρσενικών, τον αριθμό των έγκυων θηλυκών, τον τύπο των μεταβολών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο μεταβολής. Εφόσον είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει επίσης να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος/ποικιλία ζώου που χρησιμοποιήθηκε,

— δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένης της γονιμότητας, κυοφορίας και βιωσιμότητας,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, αν τα ζώα επέζησαν, χρόνο προγραμματισμένης θανάτωσης για τον τερματισμό της μελέτης,

— πίνακα που παρουσιάζει το βάρος κάθε ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα, το μέσο βάρος νεογνών, και το ατομικό βάρος των νεογνών κατά το τέλος της μελέτης,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στην ανάπτυξη μετά τη γέννηση κλπ.,

— ημέρα παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,

— στοιχεία βάρους του σώματος για τα ζώα της γενεάς Γ,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή των μικροσκοπικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον χρειάζεται,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΥΟ ΓΕΝΕΩΝ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε κλιμακωτές δόσεις σε αρκετές ομάδες θηλυκών και αρσενικών ζώων. Τα αρσενικά της γενεάς Γ μπορούν να λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και επί ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο (περίπου 56 ημέρες για τον ποντικό και 70 ημέρες για τον αρουραίο) ούτως ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στη σπερματογένεση από την δοκιμαζόμενη ουσία. Τα θηλυκά της γενεάς Γ πρέπει να λαμβάνουν δόσεις επί δύο τουλάχιστον πλήρεις κύκλους οργασμού έτσι ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στον οργασμό από τη δοκιμαζόμενη ουσία. Τα ζώα εν συνεχεία ζευγαρώνονται. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος και εν συνεχεία μόνο στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της κυήσεως και της γαλουχίας. Μετά τον απογαλακτισμό, η χορήγηση της ουσίας συνεχίζεται στους απογόνους (A_1) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέχρι την ενηλικίωση, κατά το ζευγάρωμα και την παραγωγή μιας γενεάς A_2 μέχρι τον απογαλακτισμό της γενεάς A_2. Για τη λήψη της δοκιμαζόμενης ουσίας με την εισπνοή, η μέθοδος θα απαιτήσει τροποποιήσεις.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προπαρασκευή

Πριν από το πείραμα, υγιή ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Οι γονείς (Γ) διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνσθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία.

Συνιστάται η δοκιμαζόμενη ουσία να χορηγείται μέσα στη δίαιτα ή στο πόσιμο νερό. Άλλες οδοί χορήγησης είναι επίσης αποδεκτές. Όλα τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν δόσεις με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πειραματικής περιόδου. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλο πρόσθετο για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν παράγει τοξικές επιδράσεις. Η χορήγηση των δόσεων θα πρέπει να διενεργείται επί επτά ημέρες την εβδομάδα.

Πειραματόζωα: επιλογή του είδους

Ο αρουραίος ή ο ποντικός είναι το προτιμούμενο είδος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα της γενεάς Γ που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειραματικές διαδικασίες. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη με χαμηλή γονιμότητα. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, το στέλεχος, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία.

Για μια επαρκή εκτίμηση της γονιμότητας, πρέπει να μελετηθούν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ζώα. Όλα τα δοκιμαζόμενα ζώα και τα ζώα μάρτυρες πρέπει να απογαλακτισθούν πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Αριθμός και φύλο

Κάθε ομάδα αγωγής και κάθε ομάδα μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ζώων που να αποδίδει 20 περίπου έγκυα θηλυκά σε περίοδο τοκετού ή που να μην απέχουν πολύ από την περίοδο αυτή. Αυτό έχει σαν σκοπό να δημιουργηθούν αρκετές εγκυμοσύνες και απόγονοι έτσι ώστε να εξασφαλισθεί μία ουσιαστική εκτίμηση της

ικανότητας της ουσίας να επιδρά πάνω στη γονιμότητα, εγκυμοσύνη και μητρική συμπεριφορά καθώς επίσης και στο θηλασμό, την ανάπτυξη και εξέλιξη των απογόνων (Α1) από τη στιγμή της σύλληψης ως την ωριμότητα, και από την ανάπτυξη των απογόνων τους (Α2) ως τον απογαλακτισμό.

Συνθήκες δοκιμασίας

Η τροφή και το νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Όταν πλησιάζει ο χρόνος του τοκετού, τα έγκυα θηλυκά ζώα θα πρέπει να τοποθετούνται χωριστά σε ειδικά κλουβιά τοκετού και μπορεί να τους παρέχονται υλικά κατασκευής φωλιάς.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, η ομάδα μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει το έκδοχο στην ποσότητα που χρησιμοποιείται στο υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εάν μία δοκιμαζόμενη ουσία προκαλέσει μειωμένη διαιτητική λήψη ή χρήση, τότε η χρησιμοποίηση μιας ομάδας μάρτυρα συνδυασμένης διατροφής πρέπει να θεωρείται αναγκαία. Το ιδανικό είναι εάν το υψηλότερο επίπεδο δόσης δεν περιορισθεί από τη φυσική/χημική φύση ή τις βιολογικές επιδράσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας, να προκαλεί τοξικότητα αλλά όχι θνησιμότητα στους γονείς (Γ). Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να προκαλούν ελάχιστες επιδράσεις, που να μπορούν να αποδοθούν στην δοκιμαζόμενη ουσία, και η χαμηλή δόση δεν πρέπει να παράγει οποιεσδήποτε παρατηρήσιμες επιπλοκές στους γονείς ή στους απογόνους. Όταν χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή κάψουλα, η δόση που λαμβάνει κάθε ζώο θα πρέπει να βασίζεται στο ιδιαίτερο βάρος του σώματος κάθε ζώου και να προσαρμόζεται κάθε εβδομάδα. Για τα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η χορήγηση δόσεων πρέπει να βασίζεται στο βάρος του σώματος κατά την ημέρα 0 ή 6 της εγκυμοσύνης, εφόσον είναι αυτό επιθυμητό.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή τοξικότητα, εάν ένα επίπεδο δόσης 1 000 mm/kg τουλάχιστον δεν παράγει οποιαδήποτε στοιχεία επιπλοκής στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να μη θεωρηθούν αναγκαίες. Εάν μία προκαταρκτική μελέτη στο υψηλό επίπεδο δόσης, με σαφείς ενδείξεις μητρικής τοξικότητας, δεν παρουσιάσει επιπλοκές στη γονιμότητα, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να μη θεωρηθούν αναγκαίες.

Εκτέλεση της διαδικασίας

Πειραματικά προγράμματα

Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στους αρσενικούς γονείς (Γ) πρέπει να αρχίσει όταν έχουν ηλικία πέντε έως εννέα εβδομάδες, αφού ήδη έχουν απογαλακτισθεί και εγκλιματισθεί επί πέντε τουλάχιστον ημέρες. Στους αρουραίους, η χορήγηση δόσεων συνεχίζεται επί 10 εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος (για τους ποντικούς οκτώ εβδομάδες). Τα αρσενικά πρέπει να θανατωθούν και να εξετασθούν είτε στο τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος, ή, εναλλακτικά, μπορούν να διατηρηθούν με πειραματική δίαιτα για την ενδεχόμενη παραγωγή μιας δεύτερης ομάδας νεογνών και να θανατωθούν και να εξετασθούν σε κάποιο χρονικό σημείο πριν από το τέλος της μελέτης.

Για τους θηλυκούς γονείς (Γ), η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει πέντε ημέρες τουλάχιστον μετά τον εγκλιματισμό και να συνεχίζεται επί δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από το ζευγάρωμα. Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στα θηλυκά (Γ) πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη την περίοδο ζευγαρώματος των τριών εβδομάδων, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των απογόνων (A_1). Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι τροποποιήσεις του προγράμματος χορήγησης δόσεων με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες για τη δοκιμαζόμενη ουσία, όπως είναι το συμπέρασμα για τον μεταβολισμό της ή τη βιοσυσσώρευση. Η χορήγηση δόσεων στα ζώα της ομάδας (A_1) αρχίζει κατά τον απογαλακτισμό και τελειώνει με τη θανάτωσή τους.

Διαδικασία ζευγαρώματος

Στις μελέτες τοξικότητας αναπαραγωγής μπορούν να εφαρμοσθούν είτε ζευγαρώματα τύπου $^1/_1$ (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό) ή $^1/_2$ (ένα αρσενικό προς δύο θηλυκά).

Με βάση τον τύπο ζευγαρώματος $^1/_1$, ένα θηλυκό πρέπει να τοποθετηθεί με το ίδιο αρσενικό μέχρις ότου επέλθει η εγκυμοσύνη ή μέχρις ότου περάσουν τρεις εβδομάδες. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή βύσματος από πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Η ημέρα 0 της εγκυμοσύνης ορίζεται σαν ημέρα της ανεύρεσης πηγμένου σπέρματος ή σπέρματος. Λαμβανομένης υπόψη της σπερματογένεσης, οι απόγονοι (A_1) δεν πρέπει να ζευγαρωθούν μέχρι να φθάσουν σε ηλικία τουλάχιστον των έντεκα εβδομάδων για τους ποντικούς και των 13 εβδομάδων για τους αρουραίους. Για το ζευγάρωμα των απογόνων (A_1) γίνεται τυχαία επιλογή ενός αρσενικού και ενός θηλυκού από κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, για διασταύρωση με ένα νεογνό μιας άλλης ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από άλλη μητέρα που ανήκει στην ίδια ομάδα δόσεων, για την παραγωγή μιας γενεάς A_2. Τα αρσενικά και τα θηλυκά της γενεάς A_1 που δεν επιλέγησαν για ζευγάρωμα θανατώνονται κατά τον απογαλακτισμό.

Τα ζευγάρια εκείνα που δεν ζευγαρώνουν πρέπει να εξετασθούν για να προσδιορισθεί η αιτία της φαινομενικής στειρότητας. Στην έρευνα αυτή περιλαμβάνονται διαδικασίες όπως παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλους αποδεδειγμένους πατέρες ή μητέρες και μικροσκοπική εξέταση των αναπαραγωγικών οργάνων και η εξέταση του κύκλου οργασμού ή της σπερματογένεσης.

Αριθμός νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα

Τα ζώα που λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης γονιμότητας επιτρέπεται να γεννήσουν κανονικά και να μεγαλώσουν τα παιδιά τους μέχρι το στάδιο του απογαλακτισμού χωρίς ιδιαίτερη προτυποποίηση των νεογνών.

Εάν ακολουθηθεί η προτυποποίηση, προτείνεται η παρακάτω διαδικασία:

Μεταξύ της πρώτης και τέταρτης ημέρας μετά τη γέννηση, ο αριθμός των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα μπορεί να διορθωθεί με την αφαίρεση των πλεοναζόντων νεογνών με επιλογή, έτσι ώστε να δημιουργηθούν όσο δυνατόν πλησιέστερα τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ανά ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα. Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την ύπαρξη τεσσάρων νεογνών ανά φύλο σε κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, είναι αποδεκτή η μερική διόρθωση (π.χ. 5 αρσενικά και 3 θηλυκά). Δεν γίνονται δεκτές διορθώσεις για ομάδες νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα και που περιλαμβάνουν λιγότερα από οκτώ νεογνά. Η διόρθωση των ομάδων νεογνών (A_2) από τις ίδιες μητέρες γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο.

Παρατηρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμασίας, κάθε ζώο πρέπει να παρατηρείται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και άλλα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά το ζευγάρωμα, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται κάθε εβδομάδα. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η κατανάλωση τροφής μπορεί να μετράται προαιρετικά κάθε μέρα. Μετά τον τοκετό, και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις κατανάλωσης τροφής την ίδια μέρα με τη ζύγιση των ομάδων νεογνών κάθε μητέρας. Οι αρσενικοί και θηλυκοί γονείς (Γ και A_1) πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης δόσεων και μετέπειτα κάθε εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

Η διάρκεια κυήσεως πρέπει να υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τη γέννηση, για να βρεθεί ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, ο αριθμός των θνησιγενών, ο αριθμός των ζωντανών και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών.

Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώθηκαν την τέταρτη ημέρα πρέπει να διατηρηθούν και να μελετηθούν για ενδεχόμενα ελαττώματα. Τα ζωντανά νεογνά πρέπει να μετρηθούν και οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα να ζυγιστούν το επόμενο πρωί μετά τη γέννηση καθώς επίσης και την τέταρτη και έβδομη ημέρα, και μετέπειτα κάθε εβδομάδα μέχρι το τέλος την μελέτης, οπότε τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται χωριστά. Πρέπει να καταγράφονται οι φυσικές ανωμαλίες ή οι ανωμαλίες συμπεριφοράς που παρατηρούνται στις μητέρες ή στους απογόνους.

Παθολογική εξέταση

Νεκροψία

Όλα τα ενήλικα ζώα των γενεών Γ και A_1 πρέπει να θανατωθούν όταν πλέον δεν χρειάζονται για την εκτίμηση των αναπαραγωγικών επιδράσεων. Οι απόγονοι της γενεάς A_1 που δεν επιλέγησαν για ζευγάρωμα και όλοι οι απόγονοι της γενεάς A_2 πρέπει να θανατωθούν μετά τον απογαλακτισμό.

Κατά το χρόνο της θανάτωσης ή του θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ζώα των γενεών Γ και A_1 πρέπει να εξετάζονται μικροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές, με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα νεογνά πρέπει να εξετάζονται για ελαττώματα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Οι ωοθήκες, η μήτρα, ο τράχηλος, ο κόλπος, οι όρχεις, η επιδιδυμίδα, η σπερματοδόχος κύστη, ο προστάτης, ο πηκτικός αδένας, η υπόφυση και τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των επιλεγέντων για ζευγάρωμα ζώων των γενεών Γ και A_1 πρέπει να διατηρηθούν, εφόσον χρειάζεται, για μικροσκοπική εξέταση. Στη σπάνια περίπτωση που τα όργανα αυτά δεν έχουν εξετασθεί σε άλλες μελέτες πολλαπλών δόσεων, πρέπει να εξετασθούν μικροσκοπικά σε όλα τα ζώα (Γ και A_1) των ομάδων υψηλής δόσης και ελέγχου και, εφόσον είναι δυνατόν, στα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα όργανα που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα ζώα αυτά πρέπει εν συνεχεία να εξετασθούν στα ζώα των άλλων ομάδων δόσεων. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να γίνει μικροσκοπική εξέταση σε όλους τους ιστούς που παρουσιάζουν μακροσκοπικές παθολογικές μεταβολές. Όπως προτάθηκε στις διαδικασίες ζευγαρώματος, τα αναπαραγωγικά όργανα των ζώων που είναι ύποπτα στειρότητας, μπορούν να υποβληθούν σε μικροσκοπική εξέταση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα μπορούν να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των έγκυων ζώων, τον τύπο των μεταβολών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο μεταβολής. Εφόσον είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση του πειράματος πρέπει επίσης να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος/στέλεχος ζώου που χρησιμοποιήθηκε,
— δεδομένα τοξικής αντίδρασης κατά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων δεικτών γονιμότητας, κυοφορίας και βιωσιμότητας,
— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, αν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
— πίνακα που παρουσιάζει το βάρος κάθε ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα, το μέσο βάρος των νεογνών, και το ατομικό βάρος των νεογνών κατά το τέλος της μελέτης,
— τοξικές ή άλλες επιδράσεις, στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στην ανάπτυξη μετά τη γέννηση κλπ.,
— ημέρα παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
— στοιχεία βάρους του σώματος για τα ζώα των γενεών Γ και A_1 που επιλέγησαν για ζευγάρωμα,
— ευρήματα νεκροψίας,
— λεπτομερή περιγραφή όλων των μικροσκοπικών ευρημάτων,
— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον χρειάζεται,
— συζήτηση των αποτελεσμάτων,
— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από κατάλληλη οδό. Ανάλογα με το σκοπό της μελέτης, η ουσία μπορεί να χορηγηθεί σε μία δόση ή σε επαναλαμβανόμενες δόσεις σε καθορισμένα διαστήματα, σε μία ή περισσότερες ομάδες πειραματοζώων. Έπειτα, ανάλογα με τον τύπο της μελέτης, η ουσία ή/και οι μεταβολίτες προσδιορίζονται στα υγρά του σώματος, στους ιστούς ή/και στα απεκκρίματα. Μελέτες μπορούν να διενεργηθούν με «μη σεσημασμένες» ή «σεσημασμένες» μορφές της δοκιμαζόμενης ουσίας. Όπου χρησιμοποιείται σήμανση, πρέπει να γίνεται στην ουσία κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για την τύχη της ενώσεως.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Υγιή νεαρά ζώα πλήρους ανάπτυξης εγκλιματίζονται στις συνθήκες εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον μέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία τα ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και τοποθετούνται σε ομάδες αγωγής. Σε ειδικές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολύ νεαρά, έγκυα ζώα ή ζώα τα οποία έχουν υποστεί προηγούμενη αγωγή.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Οι μελέτες τοξικοκινητικής μπορούν να διεξαχθούν σε ένα ή περισσότερα κατάλληλα είδη ζώων και πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ή που υπάρχει πρόθεση να χρησιμοποιηθούν σε άλλες τοξικολογικές μελέτες πάνω στην ίδια δοκιμαζόμενη ουσία. Όταν σε μια δοκιμασία χρησιμοποιούνται τρωκτικά, η διαφορά βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20% του μέσου βάρους.

Αριθμός και φύλο

Για μελέτες απορρόφησης και απέκκρισης, πρέπει αρχικά να υπάρχουν τέσσερα ζώα σε κάθε ομάδα δόσης. Η προτίμηση του φύλου δεν είναι επιτακτική, αλλά κάτω από ορισμένες περιστάσεις πιθανόν να χρειάζεται η μελέτη και των δύο φύλων. Εάν τα δύο γένη αντιδρούν διαφορετικά, τότε πρέπει να δοκιμαστούν τέσσερα ζώα από κάθε φύλο. Στην περίπτωση μελετών με ζώα μη τρωκτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερος αριθμός ζώων.

Όταν μελετάται η ιστολογική κατανομή, για το αρχικό μέγεθος της ομάδας πρέπει να ληφθούν υπόψη τόσο ο αριθμός των ζώων που θα θανατωθούν σε κάθε χρονικό σημείο όσο και ο αριθμός των χρονικών σημείων που θα εξετάσθούν. Όταν μελετάται ο μεταβολισμός, το μέγεθος της ομάδας σχετίζεται με τις ανάγκες της μελέτης.

Για μελέτες πολλαπλής δόσης καθώς επίσης και για μελέτες πολλαπλών χρονικών σημείων, για το μέγεθος της ομάδας πρέπει να ληφθεί υπόψη ο αριθμός των χρονικών σημείων και των σχεδιαζόμενων θανατώσεων. Η ομάδα δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να περιέχει λιγότερα από δύο ζώα. Το μέγεθος της ομάδας πρέπει να είναι αρκετό για να παρέχει επακριβή προσδιορισμό πρόσληψης, του plateau και της απόληψης (ανάλογα) της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών.

Επίπεδα δόσεων

Στην περίπτωση χορήγησης μιας και μόνο δόσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Πρέπει να υπάρχει μία χαμηλή δόση, στην οποία δεν παρατηρούνται καθόλου τοξικές επιδράσεις, και μία υψηλή δόση, στην οποία μπορούν να υπάρξουν μεταβολές στις τοξικοκινητικές παραμέτρους ή στην οποία συμβαίνουν τοξικές επιδράσεις.

Στην περίπτωση χορήγησης επαναλαμβανόμενων δόσεων η χαμηλή δόση είναι συνήθως επαρκής, αλλά σε ορισμένες περιστάσεις μπορεί επίσης να χρειάζεται μια υψηλή δόση.

Οδός χορήγησης

Οι τοξικοκινητικές μελέτες πρέπει να εκτελούνται με τη χρησιμοποίηση της ίδιας οδού και, όπου είναι δυνατόν, του ίδιου εκδόχου με το έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε ή που υπάρχει πρόθεση να χρησιμοποιηθεί σε άλλες μελέτες τοξικότητας. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα με καθετήρα στομάχου ή μέσα στην τροφή, επιτίθεται στο δέρμα, ή χορηγείται με εισπνοή σε καθορισμένα διαστήματα σε ομάδες πειραματόζωων. Η ενδοφλέβια χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμη για τον καθορισμό της σχετικής απορρόφησης από άλλες οδούς. Επιπλέον, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν για τον τρόπο κατανομής αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση μιας ουσίας.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα επίδρασης του εκδόχου πάνω στην δοκιμαζόμενη ουσία. Πρέπει να δοθεί προσοχή στις διαφορές απορρόφησης μεταξύ της χορήγησης των δοκιμαζόμενων ουσιών με καθετήρα στομάχου και με τροφή, καθώς επίσης και στην ανάγκη για έναν ακριβή καθορισμό της δόσης, ιδιαίτερα όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται με την τροφή.

Περίοδος παρατήρησης

Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται όλα τα σημεία τοξικότητας καθώς επίσης και άλλα σχετικά κλινικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειας.

Διαδικασία

Μετά τη ζύγιση των πειραματοζώων, η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από κατάλληλη οδό. Εάν θεωρηθεί ότι έχει σημασία, είναι δυνατόν η ουσία να χορηγηθεί μετά από νηστεία των πειραματοζώων.

Απορρόφηση

Ο ρυθμός και η έκταση απορρόφησης της χορηγούμενης ουσίας μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, με ή χωρίς ομάδες αναφοράς ([1]), π.χ. με:

— τον προσδιορισμό της ποσότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών στα απεκκρίματα, όπως είναι τα ούρα, η χολή, τα κόπρανα, ο εκπνεόμενος αέρας και της ποσότητας που παραμένει στο πτώμα,

— τη σύγκριση της βιολογικής αντίδρασης (π.χ. μελέτες οξείας τοξικότητας) μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδων μαρτύρων ή/και ομάδων αναφοράς,

— τη σύγκριση της ποσότητας της απεκκρινόμενης ουσίας ή/και του μεταβολίτη από τους νεφρούς στις ομάδες του πειράματος και στις ομάδες αναφοράς,

— τον προσδιορισμό της επιφάνειας που περικλείεται από την καμπύλη επιπέδου πλάσματος-χρόνου της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών και σύγκριση με δεδομένα που προέρχονται από ομάδα αναφοράς.

([1]) Στη μέθοδο αυτή, ομάδα αναφοράς είναι η ομάδα εκείνη στην οποία η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από μία άλλη οδό που εξασφαλίζει πλήρη διαθεσιμότητα της δόσης.

Κατανομή

Επί του παρόντος υπάρχουν δύο προσεγγίσεις, η μία ή και οι δύο από τις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση των τρόπων κατανομής:

— χρήσιμες ποιοτικές πληροφορίες λαμβάνονται με τη χρήση τεχνικών μεθόδων αυτοραδιογραφίας ολόκληρου του σώματος,

— ποσοτικές πληροφορίες λαμβάνονται με τη θανάτωση ζώων σε διαφορετικούς χρόνους μετά από έκθεση και καθορισμό της συγκέντρωσης και της ποσότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών στους ιστούς και στα όργανα.

Απέκκριση

Στις μελέτες απέκκρισης, συλλέγονται τα ούρα, τα κόπρανα και ο εκπνεόμενος αέρας και, σε μερικές περιπτώσεις, η χολή.

Η ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών στα απεκκρίματα αυτά πρέπει να μετράται αρκετές φορές μετά την έκθεση, είτε έως ότου να έχει απεκκριθεί το 95 % περίπου της χορηγηθείσης δόσης είτε επί επτά ημέρες, οποιοδήποτε από τα δύο συμβεί πρώτο.

Σε ειδικές περιπτώσεις, η απέκκριση της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γάλα πειραματοζώων σε κατάσταση γαλακτοφορίας μπορεί να χρειάζεται εξέταση.

Μεταβολισμός

Για τον καθορισμό της έκτασης και του τρόπου μεταβολισμού πρέπει να υποστούν ανάλυση βιολογικά δείγματα με κατάλληλες τεχνικές μεθόδους. Η δομή των μεταβολιτών πρέπει να διασαφηνισθεί και να προταθούν κατάλληλες οδοί μεταβολισμού όπου υπάρχει ανάγκη να δοθούν απαντήσεις σε ερωτήματα που προκύπτουν από προηγούμενες τοξικολογικές μελέτες. Ίσως να είναι χρήσιμο να εκτελεσθούν μελέτες in vitro για τη λήψη πληροφοριών για τις οδούς μεταβολισμού.

Περισσότερες πληροφορίες για τη σχέση του μεταβολισμού προς την τοξικότητα μπορούν να ληφθούν από βιοχημικές μελέτες, όπως είναι ο καθορισμός των επιδράσεων επί των ενζυματικών συστημάτων μεταβολισμού, η απόληψη ενδογενών μη πρωτεϊνούχων σουλφυδρυλοενώσεων και η δέσμευση της ουσίας με μακρομόρια.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Σύμφωνα με τον τύπο της εκτελούμενης μελέτης, τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακες που θα συνοδεύονται, όπου χρειάζεται, από γραφικές παραστάσεις. Για κάθε ομάδα του πειράματος πρέπει να αναφέρονται, όπου χρειάζεται, οι μέσες και στατιστικές διαφορές μετρήσεων αναφορικά με το χρόνο, τη χορήγηση δόσεων, τους ιστούς και τα όργανα. Η έκταση της απορρόφησης και η ποσότητα και ο ρυθμός απέκκρισης πρέπει να καθορίζονται με κατάλληλες μεθόδους. Όταν εκτελούνται μελέτες μεταβολισμού, πρέπει να δίνεται η δομή των εξακριβωμένων μεταβολιτών και να παρουσιάζονται οι πιθανές οδοί μεταβολισμού.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Σύμφωνα με τον τύπο της εκτελούμενης μελέτης, η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, τροφή, κλπ.,

— χαρακτηρισμό σεσημασμένων υλικών, εφόσον χρησιμοποιήθηκαν,

— επίπεδα δόσης και διαστήματα που χρησιμοποιήθηκαν,

— οδό/οδούς χορήγησης και τυχόν έκδοχα που χρησιμοποιήθηκαν,

— τοξικές και άλλες επιδράσεις που παρατηρήθηκαν,

— μεθόδους καθορισμού της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένου του εκπνεόμενου αέρα,

— αναπαράσταση σε πίνακες των μετρήσεων κατά φύλο, δόση, περιοχή δόσης, χρόνο, ιστούς και όργανα,

— παράταση της έκτασης απορρόφησης και απέκκρισης σε σχέση με το χρόνο,

— μεθόδους για το χαρακτηριστικό και εξακρίβωση μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα,

— μεθόδους βιοχημικών μετρήσεων αναφορικά με το μεταβολισμό,

— προτεινόμενες οδούς μεταβολισμού,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενικές πληροφορίες, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενικές πληροφορίες, μέρος Β.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ ΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Μια ποικιλία απλοειδών και διπλοειδών στελεχών του μύκη Saccharomyces cerevisiae μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της παραγωγής των μεταλλάξεων γονιδίων που προκαλούνται με χημικά μέσα, με μεταβολική ενεργοποίηση και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

Έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα πρόσω μετάλλαξης σε απλοειδή στελέχη, όπως είναι η μέτρηση της μετάλλαξης από ερυθρά μεταλλαχθέντα στελέχη που απαιτούν αδενίνη (ade-1, ade-2), σε λευκά μεταλλαχθέντα στελέχη που απαιτούν διπλή αδενίνη καθώς και επιλεκτικά συστήματα, όπως είναι η επαγωγή αντίστασης σε καναβανίνη και κυκλοεξιμίδιο.

Το ευρύτερα επιβεβαιωμένο σύστημα αντίστροφης μετάλλαξης περιλαμβάνει χρήση του απλοειδούς στελέχους XV 185-14 C, το οποίο μεταφέρει τις ασυνθετικές μεταλλάξεις ochre-ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 και trp 5-48, που είναι αντιστρέψιμες από μεταλλαξιογόνα υποκατάστασης βάσης, τα οποία προκαλούν ειδικές μεταλλάξεις θέσεων ή μεταλλάξεις αναστολέα ώχρας. Το XV 185-14 C φέρει επίσης τον δείκτη his 1-7, μία δυσυνθετική μετάλλαξη που αντιστρέφεται κυρίως από μεταλλάξεις δεύτερης θέσης, και τον δείκτη hom 3-10, ο οποίος αντιστρέφεται από μεταλλαξιογόνα μετατόπισης πλαισίου.

Στα διπλοειδή στελέχη του Saccharomyces cerevisiae, το μόνο ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος είναι το D_7, το οποίο είναι ομόζυγο ως προς το ilv 1-92.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Πρέπει να παρασκευαστούν διαλύματα των δοκιμαζόμενων χημικών ουσιών και των ουσιών ελέγχου ή αναφοράς λίγο πριν από τη δοκιμασία, με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Για υδρόφοβες οργανικές ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιηθεί διάλυμα μέχρι 2% κατ' όγκο σε οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες, τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης. Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα συνεργό μεταμιτοχονδριακό κλάσμα από το ήπαρ τρωκτικών που έχουν υποστεί προηγούμενα αγωγή με παράγοντες που επάγουν ένζυμα. Η χρήση άλλων ειδών, οργανισμών, ιστών, μεταμιτοχονδριακών κλασμάτων ή διαδικασιών μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για μεταβολική ενεργοποίηση.

Συνθήκες δοκιμασίας

Στελέχη δοκιμασιών

Το απλοειδές στέλεχος XV 185-14 C και το διπλοειδές στέλεχος D_7 είναι τα στελέχη που χρησιμοποιούνται περισσότερο σε μελέτες σημειακής μετάλλαξης. Άλλα στελέχη μπορούν επίσης να είναι κατάλληλα.

Μέσον καλλιέργειας

Προσφυές μέσον καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης κυττάρων και του αριθμού των μεταλλαχθέντων στελεχών.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων

Εκτελούνται συγχρόνως με τη δοκιμασία θετικοί έλεγχοι, έλεγχοι χωρίς προηγούμενη αγωγή και έλεγχοι διαλυτών. Χρησιμοποιούνται κατάλληλες χημικές ουσίες θετικού ελέγχου για κάθε ειδικό τελικό σημείο μετάλλαξης.

Συγκέντρωση έκθεσης

Χρησιμοποιούνται πέντε τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Για τοξικές ουσίες, η υψηλότερη δοκιμαζόμενη συγκέντρωση δεν πρέπει να μειώνει την επιβίωση κάτω από 5 έως 10%. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους, με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για τις πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση καθορίζεται κατά περίπτωση.

Συνθήκες επώασης

Οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο επωάζονται τέσσερις έως επτά ημέρες σε θερμοκρασία 28 έως 30 °C σε συνθήκες σκότους.

Συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υποκαλλιέργειες με συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης μέσα στα αποδεκτά κανονικά πλαίσια.

Αριθμός επαναλήψεων

Τρεις τουλάχιστον διπλές καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε συγκέντρωση για τη δοκιμασία των πρωτοτροφικών στελεχών που παράγονται από τη μετάλλαξη γονιδίων και για τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Στην περίπτωση πειραμάτων με τη χρήση δεικτών, όπως είναι ο hom 3-10 με χαμηλό ρυθμό μετάλλαξης, ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να αυξηθεί για να δώσει αποτελέσματα σημαντικά από στατιστική άποψη.

Διαδικασία

Η κατεργασία των στελεχών του Saccharomyces cerevisiæ γίνεται συνήθως με διαδικασία υγρού θρεπτικού υλικού που περιλαμβάνει στάσιμα ή βλαστάνοντα κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα πρέπει να γίνονται σε βλαστάνοντα κύτταρα: 1 — 5 × 10^7 κύτταρα/ml εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία μέχρι 18 ώρες σε θερμοκρασία 28 έως 37 °C, με ανάδευση. Προστίθεται επαρκής ποσότητα μικροσωμικού κλάσματος κατά τη διάρκεια της κατεργασίας, όταν επιβάλλεται. Στο τέλος της κατεργασίας, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, πλένονται και εμφυτεύονται σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας.

Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο καταμετρούνται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και της προκληθείσης μετάλλαξης γονιδίων.

Εάν το πρώτο πείραμα είναι αρνητικό, ένα δεύτερο πείραμα πρέπει να γίνει με κύτταρα στάσιμα. Εάν το πρώτο πείραμα είναι θετικό αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί σ' ένα κατάλληλο ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα που δίνει τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν, τον αριθμό των μεταλλαχθέντων στελεχών, την επιβίωση και τη συχνότητα των μεταλλαχθέντων στελεχών. Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ένα ανεξάρτητο πείραμα. Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμούνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε,

— συνθήκες δοκιμασίας: κύτταρα σε στάσιμη φάση ή σε βλάστηση, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, θερμοκρασία και διάρκεια επώασης, συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης,

— συνθήκες αγωγής: επίπεδα έκθεσης, διαδικασία και διάρκεια αγωγής, θερμοκρασία αγωγής, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

— αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν, αριθμός μεταλλαχθέντων στελεχών, επιβίωση και συχνότητα μεταλλαχθέντων στελεχών, σχέση δόσης/αποτελέσματος, αν μπορεί να εφαρμοστεί, στατιστική εκτίμηση των δεδομένων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Ο μιτωτικός ανασυνδυασμός στον Saccharomyces cerevisiae μπορεί να ανιχνευθεί ανάμεσα στα γονίδια (ή συνηθέστερα ανάμεσα σε ένα γονίδιο και το κεντρομερίδιό του) καθώς επίσης και μέσα στα γονίδια. Το πρώτο φαινόμενο καλείται μιτωτικός επιχιασμός και παράγει αντίστοιχα προϊόντα, ενώ το τελευταίο είναι συχνότερα μη αντίστοιχο και καλείται μεταστροφή γονιδίων. Ο επιχιασμός δοκιμάζεται συνήθως με την παραγωγή υπολειπομένων ομοζύγων αποικιών ή τομέων που παράγονται σε ένα ετερόζυγο στέλεχος, ενώ η μεταστροφή γονιδίων δοκιμάζεται με την παραγωγή πρωτοτροφικών αναστροφέων που παράγονται σε ένα αυξοτροπικό ετεροαλληλομορφικό στέλεχος που φέρει δύο διαφορετικά ελαττωματικά αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα στελέχη για την ανίχνευση της μιτωτικής μεταστροφής γονιδίων είναι τα D_4 (ετεροαλληλόμορφα σε ade 2 και trp 5), το D_7 (ετεροαλληλόμορφα σε trp 5) και το JD 1 (ετεροαλληλόμορφα σε his 4 και trp 5) και το BZ_{34} (ετεροαλληλόμορφα, σε arg 4). Ο μιτωτικός επιχιασμός που παράγει ερυθρούς και ροδόχρους ομόζυγους τομείς μπορεί να δοκιμαστεί στο D_5 ή στο D_7 (το οποίο επίσης μετρά την μιτωτική μετατροπή γονιδίων και την αντίστροφη μετάλλαξη σε ilv 1-92). Και τα δύο στελέχη στην περίπτωση αυτή είναι ετεροαλληλόμορφα ως προς συμπληρωματικά αλληλόμορφα του ade 2.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Τα διαλύματα των δοκιμαζομένων χημικών ουσιών και των μαρτύρων ή ουσιών ελέγχου και αναφοράς πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη δοκιμασία, με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Για υδρόφοβες οργανικές ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιείται διάλυμα μέχρι 2% κατ' όγκο σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα εκτίθενται στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες, τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης.

Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα συνεργό μεταμιτοχονδριακό κλάσμα από το ήπαρ τρωκτικών που έχουν υποστεί προηγούμενη αγωγή με παράγοντες που επάγουν ένζυμα. Η χρήση άλλων ειδών οργανισμών, ιστών, μεταμιτοχονδριακών κλασμάτων ή διαδικασιών μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για μεταβολική ενεργοποίηση.

Συνθήκες δοκιμασίας

Στελέχη δοκιμασιών

Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι τα διπλοειδή D_4, D_5, D_7 και JD 1. Η χρήση και άλλων στελεχών μπορεί να είναι κατάλληλη.

Μέσον καλλιέργειας

Προσφυές μέσον καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και της συχνότητας του μιτωτικού ανασυνδυασμού.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να εκτελούνται συγχρόνως με τη δοκιμασία θετικοί έλεγχοι, έλεγχοι χωρίς προηγούμενη αγωγή και έλεγχοι διαλυτών με μάρτυρες. Για κάθε τελικό σημείο ανασυνδυασμού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες χημικές ουσίες σαν θετικοί μάρτυρες.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν πέντε τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Μεταξύ των παραγόντων που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι η κυτταροτοξικότητα και η διαλυτότητα. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν πρέπει να έχουν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Για τις τοξικές χημικές ουσίες, η υψηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δεν πρέπει να μειώνει την επιβίωση κάτω από 5 έως 10 %. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι τα όρια διαλυτότητας, με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για τις πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές χημικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση του πειράματος πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Τα κύτταρα μπορούν να εκτίθενται σε δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες είτε σε στάσιμη φάση είτε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, για περιόδους μέχρι 18 ωρών. Ωστόσο, για μακρές περιόδους αγωγής, οι καλλιέργειες πρέπει να επιθεωρούνται μικροσκοπικά για τον σχηματισμό σπορίων, η παρουσία των οποίων αχρηστεύει το πείραμα.

Συνθήκες επώασης

Οι καλλιέργειες επωάζονται στο σκοτάδι επί τέσσερις έως επτά ημέρες, σε 28 έως 30 °C. Οι καλλιέργειες αυτές που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή των ερυθρών και ροδόχρων ομοζύγων τομέων που παράγονται από μιτωτικό επιχιασμό, πρέπει να διατηρούνται σε ψυγείο (4 °C) για μία έως δύο ημέρες πριν από την καταμέτρηση, έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι κατάλληλες χρωματισμένες αποικίες.

Συχνότητες αυθόρμητου μιτωτικού ανασυνδυασμού

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υποκαλλιέργειες με συχνότητες αυθόρμητου μιτωτικού ανασυνδυασμού μέσα σε αποδεκτά κανονικά πλαίσια.

Αριθμός επαναλήψεων

Ένα ελάχιστο όριο τριών επαναλήψεων μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να χρησιμοποιείται ανά συγκέντρωση για το πείραμα των πρωτοτροφικών που παράγονται από μιτωτική μεταστροφή γονιδίων καθώς και για τη βιωσιμότητα. Στην περίπτωση της δοκιμασίας των υπολειπόμενων ομοζυγωτών που παράγονται από μιτωτικό επιχιασμό, ο αριθμός καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να αυξηθεί ώστε να υπάρξει ικανός αριθμός αποικιών.

Διαδικασία

Η αγωγή των στελεχών του Saccharomyces cerevisiae εκτελείται συνήθως μέσα σε υγρό με στάσιμα ή αναπτυσσόμενα κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα πρέπει να γίνονται με αναπτυσσόμενα κύτταρα. 1—5 × 10^7 κύτταρα/ml εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία μέχρι 18 ώρες, σε 28 ° έως 37 °C, με ανάδευση. Κατά τη διάρκεια της αγωγής προστίθεται επαρκής ποσότητα μικροσωμικού κλάσματος όταν επιβάλλεται. Κατά το τέλος της αγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, πλένονται και εμφυτεύονται σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας. Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ καταμετρούνται για προσδιορισμό επιβίωσης και επαγωγής μιτωτικού ανασυνδυασμού. Εάν το πρώτο πείραμα είναι αρνητικό, τότε ένα δεύτερο πείραμα πρέπει να γίνει με στάσιμα κύτταρα. Εάν το πρώτο πείραμα είναι θετικό, αυτό πρέπει να επιβεβαιώνεται σε κατάλληλο ανεξάρτητο πείραμα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακος, ο οποίος δίνει τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν, τον αριθμό των στελεχών ανασυνδυασμού, την επιβίωση και τη συχνότητα των στελεχών ανασυνδυασμού. Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται αν είναι δυνατό με ανεξάρτητο πείραμα. Η εκτίμηση των δεδομένων γίνεται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση του πειράματος πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε,

— συνθήκες δοκιμασίας: κύτταρα σε στάσιμη φάση ή σε φάση ανάπτυξης, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, θερμοκρασία και διάρκεια επώασης, σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης,

— συνθήκες αγωγής: συγκέντρωση ουσίας έκθεσης, διαδικασία και διάρκεια αγωγής, θερμοκρασία αγωγής, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

— Αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν, αριθμός των στελεχών ανασυνδυασμού, επιβίωση και συχνότητα ανασυνδυασμού, σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν μπορεί να εφαρμοστεί, στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΚΥΤΤΑΡΟ ΘΗΛΑΣΤΙΚΟΥ IN VITRO — ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2 **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3 **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών. Ευρέως χρησιμοποιούμενες σειρές κυττάρων περιλαμβάνουν τα λεμφοειδή κύτταρα ποντικού L5178Y και τις σειρές CHO και V-79 κυττάρων του κινέζικου κρικητού (chinese hamster). Στις σειρές αυτές των κυττάρων τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα συστήματα μετράνε τις μεταλλάξεις στις θέσεις θυμιδινοκινάσης (TK) υποξανθινο-γουανίνο-φωσφοριβοζύλο-τρανσφεράσης (HPRT) (1) και Na^+/K^+ ATPάσης. Τα μεταλλαξιογόνα συστήματα TK και HPRT ανιχνεύουν τις μεταλλάξεις ζεύγους βάσεων, τις μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου και τις μικρές αφαιρέσεις. Το σύστημα Na^+/K^+ ανιχνεύει μόνο τις μεταλλάξεις ζεύγους βάσεων.

Τα κύτταρα από τα οποία λείπει η θυμιδινοκινάση (TK), λόγω της πρόσω μετάλλαξης $TK^+ \rightarrow TK^-$ αντιστέκονται στη βρωμοδεσοξυουριδίνη (BrdU), στη φθοροδεσοξυουριδίνη (FdU) ή στην τριφθοροθυμιδίνη (TFT), επειδή οι αντιμεταβολίτες αυτοί δεν έχουν ενσωματωθεί στα κυτταρικά νουκλεοτίδια από τη θυμιδινοκινάση του συστήματος των εκκαθαριστικών (salvage) ενζύμων. Τα νουκλεοτίδια που χρειάζονται για τον κυτταρικό μεταβολισμό λαμβάνονται αποκλειστικά και μόνο από σύνθεση *de novo*. Με την παρουσία της θυμιδινοκινάσης, ωστόσο, η BrdU, η FdU ή η TFT ενσωματώνονται σε νουκλεοτίδια με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού μεταβολισμού και την κυτταροτοξικότητα. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιασθούν με την παρουσία του BrdU, FdZ ή TFT, ενώ τα κανονικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν θυμιδινοκινάση, δεν μπορούν. Κατά τον ίδιο τρόπο, τα κύτταρα που δεν περιέχουν HPRT επιλέγονται διά της αντίστασης στην 8-αζαγουανίνη (AG) ή στην 6-θειογουανίνη (TG). Τα κύτταρα με μεταβολή στην Na^+/K^+ ATPάση επιλέγονται διά της αντίστασης στην ουαβαΐνη.

Η κυτταροτοξικότητα καθορίζεται με μέτρηση της επίδρασης της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ικανότητα των καλλιεργειών για σχηματισμό αποικιών (κλωνική επάρκεια) ή στη μεταβολή των ρυθμών ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η συχνότητα μεταλλαχθέντων κυττάρων προσδιορίζεται με εμφύτευση γνωστού αριθμού κυττάρων σε υλικό που περιέχει τον επιλεκτικό παράγοντα για την ανίχνευση μεταλλαχθέντων κυττάρων και σε υλικό χωρίς επιλεκτικό παράγοντα για τον προσδιορισμό των επιζώντων κυττάρων. Μετά από κατάλληλη περίοδο επώασης, μετρούνται οι αποικίες. Οι συχνότητες μεταλλαχθέντων κυττάρων υπολογίζονται από τον αριθμό των μεταλλαχθεισών αποικιών, αφού ληφθεί υπόψη η επιβίωση των κυττάρων.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Κύτταρα

Σ' αυτήν τη δοκιμασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες σειρές κυττάρων. Οι σειρές αυτές περιλαμβάνουν τους υποκλώνους L5178Y, τα κύτταρα CHO ή τα κύτταρα V-79 με αποδειγμένη ευαισθησία σε χημικά μεταλλαξιογόνα, υψηλή κλωνική επάρκεια και μικρή συχνότητα αυθόρμητης μετάλλαξης. Τα κύτταρα ελέγχονται περιοδικά για καρυοτυπική ευστάθεια και πρέπει να ελέγχονται για πρόσμειξη μυκοπλάσματος. Άλλοι κυτταρικοί τύποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν εφόσον μπορεί να τεκμηριωθεί πλήρως η αξιοπιστία τους σε πείραμα για χημικά προκαλούμενες μεταλλάξεις γονιδίων.

Μέσον καλλιέργειας

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφυές μέσον καλλιέργειας και κατάλληλες συνθήκες επώασης (π.χ. θερμοκρασία, χρησιμοποιούμενα δοχεία καλλιέργειας, συγκεντρώσεις σε CO_2 και υγρασία).

Τα υλικά και οι οροί πρέπει να επιλέγονται σύμφωνα με τα επιλεκτικά συστήματα και τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία.

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστίθενται σε υλικά καλλιέργειας ή σε κατάλληλους φορείς, πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση του φορέα στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων ή το ρυθμό ανάπτυξής τους.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στην πειραματική ουσία τόσο με όσο και χωρίς εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης κυττάρων θηλαστικού. Εναλλακτικά, όπου χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι με εγγενή μεταβολική ενεργοποίηση, ο ρυθμός και η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι γνωστό ότι είναι κατάλληλα για τη δοκιμαζόμενη χημική κατηγορία.

Συνθήκες δοκιμασίας

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων με μάρτυρες

Πρέπει να συμπεριληφθούν σε κάθε πείραμα θετικοί έλεγχοι με τη χρήση τόσο μιας ουσίας άμεσης ενέργειας όσο και μιας ουσίας που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση.

Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται ένας αρνητικός έλεγχος (φορέας). Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί έλεγχοι:

— ουσίες άμεσης ενέργειας:
  — αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο,
  — υκανθόνη·
— ουσίες έμμεσης ενέργειας:
  — 2-ακετυλοαμινοφλουορένιο,
  — 7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο,
  — Ν-νιτροζοδιμεθυλαμίνη.

Όπου υπάρχει δυνατότητα, μπορεί να περιλαμβάνεται πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας με τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Συγκεντρώσεις έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν διάφορες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να δίνουν τοξικό αποτέλεσμα που να έχει σχέση με τη συγκέντρωση: η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να παράγει χαμηλό επίπεδο επιβίωσης, η δε επιβίωση στη χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι σχεδόν η ίδια με την επιβίωση στον αρνητικό έλεγχο. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας καθορίζεται κατά περίπτωση.

Διαδικασία

Ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιούνται ανά καλλιέργεια πρέπει να σχετίζεται με τη συχνότητα της αυθόρμητης μετάλλαξης. Ο γενικός κανόνας είναι η χρήση ενός αριθμού βιώσιμων κυττάρων, ο οποίος είναι δέκα φορές αντίστροφος της συχνότητας της αυθόρμητης μετάλλαξης. Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται για κατάλληλο χρόνο, στις περισσότερες δε περιπτώσεις δύο έως πέντε ώρες είναι αρκετές. Κύτταρα χωρίς επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου της έκθεσης, τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας και για την έκταση του μεταλλαχθέντος φαινοτύπου τους.

Κατά το τέλος της περιόδου έκφρασης, η οποία πρέπει να είναι επαρκής για να επιτρέπει την καλύτερη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των επαγομένων μεταλλαχθέντων κυττάρων, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υλικό με ή χωρίς επιλεκτικούς παράγοντες, για τον προσδιορισμό του αριθμού των μεταλλαχθέντων κυττάρων και της βιωσιμότητας.

Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα. Οι αριθμοί των μεμονωμένων καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο για την δοκιμαζόμενη ουσία και τον έλεγχο πρέπει να δίνονται τόσο για την επαγωγή της μετάλλαξης όσο και για την επιβίωση. Πρέπει επίσης να δίνεται ο μέσος αριθμός των αποικιών ανά καλλιέργεια καθώς και η μέση σταθερή απόκλιση. Η συχνότητα της μετάλλαξης πρέπει να εκφράζεται σαν αριθμός μεταλλαχθέντων κυττάρων ανά αριθμό επιβιωσάντων κυττάρων. Η επιβίωση και η κλωνική επάρκεια εκφράζονται σαν ποσοστό του επιπέδου του μάρτυρα.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΝ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— σειρά κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε, αριθμός καλλιεργειών κυττάρων, μέθοδοι συντήρησης καλλιεργειών κυττάρων,

— συνθήκες του πειράματος: σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, συγκέντρωση CO_2, συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, φορέας που χρησιμοποιείται, θερμοκρασία επώασης, χρόνος επώασης, διάρκεια της περιόδου έκθεσης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των εμφυτευόμενων κυττάρων και υποκαλλιεργειών καθώς και των προγραμμάτων διατροφής, εάν είναι δυνατόν), διάρκεια αγωγής, κυτταρική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της αγωγής, τύπος χρησιμοποιούμενου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούμενος επιλεκτικός παράγοντας,

— δικαιολόγηση για την επιλογή της δόσης,

— μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση του αριθμού των βιώσιμων και μεταλλαχθέντων κυττάρων,

— στατιστική εκτίμηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ DNA — ΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ DNA — ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ — IN VITRO

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμασία απρογραμμάτιστης σύνθεσης DNA (UDS) μετρά την επανόρθωση της σύνθεσης του DNA μετά την εκτομή και αφαίρεση τμήματος του DNA που περιέχουν την περιοχή της βλάβης, η οποία προκαλείται από χημικούς και φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμασία βασίζεται στην εισαγωγή τριτιωμένης θυμιδίνης (^{3}H-TdR) στο DNA κυττάρων θηλαστικών, τα οποία δεν βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η λήψη της ^{3}H-TdR μπορεί να προσδιοριστεί με αυτοραδιογραφία ή με μέτρηση υγρού σπινθηρισμού (LSC) σε DNA από κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή. Εφόσον δεν χρησιμοποιούνται αρχέτυπα ηπατοκύτταρα ποντικών, τα κύτταρα θηλαστικών μέσα στην καλλιέργεια υφίστανται αγωγή με την δοκιμαζόμενη ουσία με ή χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση. Η UDS μπορεί επίσης να μετρηθεί σε συστήματα in vivo.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες και οι μάρτυρες ελέγχου ή οι ουσίες αναφοράς πρέπει να προστεθούν σε θρεπτικό μέσον ανάπτυξης ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλο φορέα και έπειτα να διαλυθούν σε θρεπτικό μέσον ανάπτυξης για να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία. Η τελική συγκέντρωση του φορέα δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Καλλιέργειες αρχέτυπων ηπατοκυττάρων ποντικών, ανθρώπινων λεμφοκυττάρων ή καθορισμένες σειρές κυττάρων (π.χ. ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία.

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στην πειραματική ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Συνθήκες δοκιμασίας

Αριθμός καλλιεργειών

Δύο τουλάχιστον καλλιέργειες κυττάρων για την αυτοραδιογραφία και έξι καλλιέργειες κυττάρων με LSC προσδιορισμούς UDS (ή λιγότερες, εάν επιστημονικά κρίνεται σκόπιμο) είναι απαραίτητες για κάθε πείραμα.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων με μάρτυρες

Πρέπει να γίνονται συγχρόνως με κάθε πείραμα θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι (χωρίς αγωγή ή/και φορέα) με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

Παραδείγματα θετικών ελέγχων με μάρτυρες για τη δοκιμασία ηπατοκυττάρων αρουραίου είναι το 7,12-DMBA (7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο) ή το 2-AAF (2-ακετυλαμινοφλουορένιο). Στην περίπτωση καθορισμένων σειρών κυττάρων το 4-NQO (οξείδιο-N της 4-νιτροκινολίνης) είναι ένα παράδειγμα θετικού ελέγχου τόσο για αυτοραδιογραφικά πειράματα όσο και για πειράματα με LSC, που εκτελούνται χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Η N-νιτροζοδιμεθυλαμίνη αποτελεί παράδειγμα ουσίας θετικού ελέγχου, όταν χρησιμοποιούνται συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται πολλές συγκεντρώσεις της πειραματικής ουσίας επαρκείς για τον προσδιορισμό της ανταπόκρισης. Η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί μερικές κυτταροτοξικές επιδράσεις. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ενώσεις πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές χημικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της πειραματικής χημικής ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Κύτταρα

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφυές μέσον ανάπτυξης, κατάλληλη συγκέντρωση σε CO_2 καθώς και κατάλληλη θερμοκρασία και υγρασία για τη συντήρηση των καλλιεργειών. Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων πρέπει να ελέγχονται περιοδικά για πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

Επίσης είναι επιθυμητός ο περιοδικός έλεγχος των κυττάρων για σταθερότητα καρυοτύπου.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Δεν χρησιμοποιείται σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης σε καλλιέργειες αρχετύπων ηπατοκυττάρων. Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων και τα λεμφοκύτταρα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Διαδικασία

Παρασκευή καλλιεργειών

Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων παράγονται από μόνιμες καλλιέργειες (π.χ. με θρυψινοποίηση ή με αποτίναξη), εμφυτεύονται σε δοχεία καλλιέργειας με κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται σε 37 °C.

Δημιουργούνται βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατοκυττάρων αρουραίων, επιτρέποντας στα πρόσφατα αποσυνδεμένα ηπατοκύτταρα σε προσφυές μέσον να προσκολληθούν στην αναπτυσσόμενη επιφάνεια.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων γίνονται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων τεχνικών μεθόδων.

Κατεργασία των καλλιεργειών με τη δοκιμαζόμενη ουσία

Αρχέτυπα ηπατοκύτταρα αρουραίου: Πρόσφατα απομονωμένα ηπατοκύτταρα αρουραίου υφίστανται κατεργασία με την δοκιμαζόμενη ουσία σε μέσον που περιέχει ^{3}H-TdR, για κατάλληλη χρονική περίοδο. Στο τέλος της περιόδου αγωγής τα κύτταρα πρέπει να αποσυρθούν από το μέσον, να εκπλυθούν, να μονιμοποιηθούν, και να στεγνώσουν.

Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να εμβαπτισθούν σε αυτοραδιογραφικό γαλάκτωμα, να μείνουν σε 4 °C για κατάλληλο χρονικό διάστημα, να εμφανιστούν, να χρωσθούν και να γίνουν οι μετρήσεις.

Καθορισμένες σειρές κυττάρων και λεμφοκύτταρα

Τεχνικές αυτοραδιογραφίας: Οι καλλιέργειες κυττάρων εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία για κατάλληλο χρονικό διάστημα και έπειτα υφίστανται αγωγή με ^{3}H-TdR. Ο χρόνος καθορίζεται από τη φύση της ουσίας, τη δραστικότητα του συστήματος μεταβολισμού και τον τύπο των κυττάρων. Για την ανίχνευση της μέγιστης UDS, πρέπει να προστεθεί ^{3}H-TdR είτε ταυτόχρονα με την δοκιμαζόμενη ουσία είτε λίγα λεπτά μετά την έκθεση στην δοκιμαζόμενη ουσία.

Η επιλογή μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών επηρεάζεται από πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της δοκιμαζόμενης ουσίας και του ^{3}H-TdR.

Για να γίνει η διάκριση μεταξύ της UDS και του ημισυντηρητικού αναδιπλασιασμού του DNA, ο τελευταίος μπορεί να ανασταλεί, π.χ., με τη χρήση υλικού από το οποίο λείπει η αργινίνη, με χαμηλή περιεκτικότητα ορού ή με παρουσία υδροξυουρίας στο υλικό της καλλιέργειας.

Μετρήσεις της UDS *με* LSC: Πριν από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία, η είσοδος των κυττάρων στη φάση S πρέπει να εμποδιστεί, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στην πειραματική χημική ουσία όπως περιγράφεται για την αυτοραδιογραφία. Στο τέλος της περιόδου επώασης, το DNA πρέπει να αποσπαστεί από τα κύτταρα και να καθορισθεί το συνολικό περιεχόμενο DNA και η έκταση της ενσωμάτωσης του ^{3}H-TdR.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όπου, στις παραπάνω τεχνικές, χρησιμοποιούνται ανθρώπινα λεμφοκύτταρα η αναστολή του ημισυντηρητικού αναδιπλασιασμού του DNA δεν είναι αναγκαία σε μη διεγερμένες καλλιέργειες.

Ανάλυση

Αυτοραδιογραφικοί προσδιορισμοί

Για τον προσδιορισμό της UDS σε κύτταρα που βρίσκονται μέσα σε καλλιέργεια, οι πυρήνες της φάσης S, δεν καταμετρώνται. 50 τουλάχιστον κύτταρα ανά συγκέντρωση πρέπει να μετρηθούν. Οι πλάκες πρέπει να κωδικοποιηθούν πριν καταμετρηθούν. Σε κάθε πλάκα πρέπει να καταμετρηθούν διάφορα ευρέως διαχωρισμένα τυχαία πεδία. Η ποσότητα της ενσωμάτωσης ^{3}H-TdR στο κυτταρόπλασμα πρέπει να προσδιοριστεί με την καταμέτρηση τριών περιοχών μεγέθους πυρήνα μέσα στο κυτταρόπλασμα κάθε καταμετρηθέντος κυττάρου.

Προσδιορισμοί με LSC

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί επαρκής αριθμός καλλιεργειών για κάθε συγκέντρωση και για κάθε μάρτυρα για τον προσδιορισμό της UDS με LSC.

Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα.

2.1. Αυτοραδιογραφικοί προσδιορισμοί

Η έκταση της ενσωμάτωσης του ^{3}H-TdR στο κυτταρόπλασμα και ο αριθμός των κόκκων που βρέθηκαν πάνω στον πυρήνα του κυττάρου πρέπει να καταγραφούν χωριστά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσες και επικρατούσες (mode) τιμές για την περιγραφή της κατανομής της έκτασης της ενσωμάτωσης του ^{3}H-TdR στο κυτταρόπλασμα και του αριθμού των κόκκων ανά πυρήνα.

2.2. Προσδιορισμοί με LSC

Στους προσδιορισμούς με LSC, η ενσωμάτωση της ^{3}H-TdR θα πρέπει να αναφέρεται σαν dpm/μg DNA.

Η μέση τιμή dpm/μg DNA με την μέση σταθερή απόκλιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγραφεί η κατανομή της ενσωμάτωσης.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:.

— κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, πυκνότητα και αριθμός διελεύσεων κατά το χρόνο αγωγής, αριθμός καλλιεργειών κυττάρων,

— μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη συντήρηση των καλλιεργειών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του θρεπτικού μέσου, της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης σε CO_2,

— δοκιμαζόμενη ουσία, φορέας, συγκεντρώσεις και αιτιολόγηση για την επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμασία,

— στοιχεία για τα συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης,

— πρόγραμμα αγωγής,

— θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

— αυτοραδιογραφική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε,
— διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρεμπόδιση της εισόδου των κυττάρων στη φάση S,
— διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την απόσπαση του DNA και για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου DNA σε μετρήσεις LSC,
— σχέση δόσης/αποτελέσματος, όπου είναι δυνατόν,
— στατιστική εκτίμηση,
— συζήτηση των αποτελεσμάτων,
— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΔΕΛΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΙΔΩΝ IN VITRO

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η μέθοδος ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων (SCE) αποτελεί μια γρήγορη δοκιμασία για την ανίχνευση των ανταλλαγών του DNA μεταξύ δύο αδελφών χρωματίδων ενός διπλοποιημένου χρωμοσώματος. Η μέθοδος αυτή αντιπροσωπεύει την ανταλλαγή προϊόντων αναδιπλασιασμού του DNA σε φαινομενικά ομόλογες θέσεις. Η διαδικασία ανταλλαγής αφορά προφανώς θραύση του DNA και επανένωση, παρ' όλο ότι λίγα είναι γνωστά για τη μοριακή βάση. Η ανίχνευση των SCE απαιτεί τη δυνατότητα διαφορετικής σήμανσης αδελφών χρωματίδων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με ενσωμάτωση βρωμοδεσοξυουοριδίνης (BrdU) μέσα σε χρωμοσωμικό DNA για ένα ή δύο κυτταρικούς κύκλους.

Τα κύτταρα θηλαστικών in vitro εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία, με ή χωρίς σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού, εάν χρειάζεται, και καλλιεργούνται για δύο κύκλους αναδιπλασμού σε υλικό το οποίο περιέχει BrdU.

Μετά από αγωγή με αναστολέα ατράκτου (π.χ. κολχικίνη) ώστε να μαζευτούν κύτταρα σε μία μεταφασική φάση μίτωσης (μετάφαση C), τα κύτταρα συλλέγονται και γίνονται παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

— Στη δοκιμασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχέτυπες καλλιέργειες (ανθρώπινα λεμφοκύτταρα), ή καθορισμένες σειρές κυττάρων [κ.χ. κύτταρα ωοθηκών κινέζικου κρικητού (chinese hamster)]. Οι σειρές κυττάρων πρέπει να ελέγχονται για πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

— Πρέπει να χρησιμοποιηθούν προσφυές μέσον καλλιέργειας και κατάλληλες συνθήκες επώασης (π.χ. θερμοκρασία, δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση σε CO_2 και υγρασία).

— Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε μέσον καλλιέργειας ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλους φορείς πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση ενός φορέα στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων ή το ρυθμό ανάπτυξης και οι επιδράσεις στη συχνότητα των SCE πρέπει να παρακολουθούνται με έλεγχο διαλύτου.

— Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού. Εναλλακτικά, όπου χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι με εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, ο ρυθμός και η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι κατάλληλα για τη χημική κατηγορία που δοκιμάζεται.

Συνθήκες δοκιμασίας

Αριθμός καλλιεργειών

Διπλές τουλάχιστον καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για κάθε πειραματική μέτρηση.

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων μάρτυρες

Πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα θετικοί έλεγχοι με τη χρήση τόσο μιας ουσίας άμεσης ενέργειας όσο και μιας ουσίας που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να γίνεται έλεγχος του φορέα.

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί έλεγχοι:

— ουσία άμεσης ενέργειας:

— αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο·

— ουσία έμμεσης ενέργειας:

— κυκλοφωσφαμίδιο.

Όπου είναι δυνατόν μπορεί να γίνεται και πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας όπως η χημική ουσία τής δοκιμασίας.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση μπορεί να προκαλεί σημαντικές τοξικές επιδράσεις, αλλά πρέπει παρ' όλα αυτά να επιτρέπει επαρκή κυτταρικό αναδιπλασιασμό. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Διαδικασία

Παρασκευή καλλιεργειών

Καθορισμένες σειρές κυττάρων δημιουργούνται από βασικές καλλιέργειες (π.χ. με θρυψινοποίηση ή με αποτίναξη), εμφυτεύονται σε δοχεία καλλιέργειας με κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται σε 37 °C. Για μονοστρωματικές καλλιέργειες, ο αριθμός κυττάρων ανά δοχείο καλλιέργειας πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε οι καλλιέγειες να μην είναι συνενωμένες περισσότερο από 50% κατά το χρόνο της συλλογής. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καλλιέργεια εναιωρήματος.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων γίνονται από ηπαρινισμένο αίμα με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών μεθόδων και επωάζονται σε 37 °C.

Αγωγή

Τα κύτταρα σε εκθετική φάση ανάπτυξης εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία για κατάλληλη χρονική περίοδο (στις περισσότερες μία έως δύο ώρες είναι αρκετές), αλλά ο χρόνος αγωγής μπορεί να επεκταθεί μέχρι δύο πλήρεις κυτταρικούς κύκλους, σε ορισμένες περιπτώσεις. Κύτταρα χωρίς επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται στην δοκιμαζόμενη χημική ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου της έκθεσης, τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται για δύο κύκλους αναδιπλασιασμού με παρουσία BrdU. Σαν εναλλακτική διαδικασία, τα κύτταρα μπορούν να εκτεθούν ταυτόχρονα στην δοκιμαζόμενη χημική ουσία και στο BrdU για ολόκληρο το χρόνο καλλιέργειας δύο κυτταρικών κύκλων.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων υφίστανται αγωγή ενώ βρίσκονται σε ημισύγχρονη κατάσταση.

Τα κύτταρα αναλύονται κατά τη δεύτερη διαίρεσή τους μετά την αγωγή, εξασφαλίζοντας ότι οι πιο ευαίσθητες φάσεις του κυτταρικού κύκλου έχουν εκτεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία. Όλες οι καλλιέργειες στις οποίες προστίθεται το BrdU πρέπει να βρίσκονται σε σκότος ή σε ημίφως, που παράγεται με λάμπες πυράκτωσης, μέχρι το χρόνο συλλογής των κυττάρων, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η φωτόλυση του DNA που περιέχει BrdU.

Συλλογή των κυττάρων

Οι καλλιέργειες κυττάρων υφίστανται αγωγή με αναστολέα ατράκτου (π.χ. κολχικίνη) μία έως τέσσερις ώρες πριν από τη συλλογή. Κάθε καλλιέργεια συλλέγεται και υφίσταται επεξεργασία χωριστά για την παρασκευή χρωμοσωμάτων.

Ετοιμασία χρωμοσωμάτων και χρώση

Η ετοιμασία χρωμοσωμάτων γίνεται με πρότυπες κυτταρογενετικές τεχνικές. Η χρώση των πλακών για να φανούν οι SCE μπορεί να εκτελεσθεί με διάφορες τεχνικές (π.χ. μέθοδος φθορισμού και Giemsa).

Ανάλυση

Ο αριθμός των αναλυόμενων κυττάρων πρέπει να βασίζεται στη συχνότητα αυτογενούς ελέγχου των SCE. Συνήθως, 25 τουλάχιστον καλά διεσπαρμένες μεταφάσεις ανά καλλιέργεια αναλύονται για τις SCE. Οι πλάκες κωδικοποιούνται πριν από την ανάλυση. Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αναλύονται μόνο μεταφάσεις που περιέχουν 46 κεντρομερίδια.

Σε καθορισμένες σειρές κυττάρων αναλύονται μόνο μεταφάσεις που περιέχουν κεντρομερίδια ± 2 του κανονικού αριθμού. Πρέπει να αναφέρεται εάν η κεντρομερική μεταβολή της σήμανσης καταγράφεται σαν SCE. Τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο αριθμός των SCE για κάθε μετάφαση και ο αριθμός των SCE ανά χρωμόσωμα για κάθε μετάφαση πρέπει να καταγράφονται χωριστά για όλες τις καλλιέργειες που υφίστανται την αγωγή και για της καλλιέργειες του μάρτυρα.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, μέθοδοι συντήρησης της καλλιέργειας κυττάρων,
- συνθήκες του πειράματος: σύνθεση των υλικών, συγκέντρωση σε CO_2, συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, θερμοκρασία επώασης, χρόνος αγωγής, αναστολέας ατράκτου που χρησιμοποιήθηκε, συγκέντρωσή του και διάρκεια αγωγής με αυτόν, τύπος συστήματος ενεργοποίησης θηλαστικού που χρησιμοποιήθηκε, θετικές και αρνητικές δοκιμασίες (μάρτυρες),
- αριθμός καλλιεργειών κυττάρων ανά δοκιμασία,
- λεπτομέρειες της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των τριβλιών,
- αριθμός των μεταφάσεων που αναλύθηκαν (στοιχεία χωριστά για κάθε καλλιέργεια),
- μέσος αριθμός SCE ανά μετάφαση και ανά χρωμόσωμα,
- κριτήρια για την καταγραφή των SCE,
- αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,
- σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν είναι δυνατόν,
- στατιστική αξιολόγηση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΥ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ DROSOPHILA MELANOGASTER

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμασία αυτή (SLRL) με τη χρήση της Drosophila melanogaster ανιχνεύει την εμφάνιση μεταλλάξεων σημείου καθώς και μικρών αφαιρέσεων στη σειρά γεννητικών κυττάρων του εντόμου. Η δοκιμασία αυτή αποτελεί δοκιμή πρόσω μετάλλαξης για την εξέταση μεταλλάξεων 800 περίπου θέσεων επί του χρωμοσώματος Χ, που αντιπροσωπεύει το 80% περίπου όλων των Χ-χρωμοσωμικών θέσεων. Το χρωμόσωμα Χ αντιπροσωπεύει περίπου το ένα πέμπτο ολόκληρου του απλοειδούς γονοτύπου.

Οι μεταλλάξεις στο Χ-χρωμόσωμα της Drosophila melanogaster εκφράζονται φαινοτυπικά σε αρσενικά που φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο. Όταν η μετάλλαξη είναι θανατηφόρα στην ημίζυγη κατάσταση, η παρουσία της συμπεραίνεται από την απουσία μιας συνομοταξίας αρσενικών απογόνων από τις δύο που παράγονται κανονικά από μια ετερόζυγη θηλυκή. Η δοκιμασία SLRL επωφελείται των γεγονότων αυτών με τη χρήση ειδικά σημασμένων και τακτοποιημένων χρωμοσωμάτων.

.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Βασικές καλλιέργειες

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αρσενικά μιας καλά καθορισμένης καλλιέργειας φυσικού τύπου και τα θηλυκά της βασικής καλλιέργειας Muller-5. Άλλες κατάλληλα σημασμένες θηλυκές βασικές καλλιέργειες με πολλαπλά ανεστραμένα Χ-χρωμοσώματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει να διαλύονται στο νερό. Οι ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό μπορούν να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα (π.χ. μείγμα αιθανόλης και Tween-60 ή 80), έπειτα να αραιωθούν με νερό ή διάλυμα χλωριούχου νατρίου πριν τη χορήγηση. Το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO) πρέπει να αποφεύγεται σαν έκδοχο.

Αριθμός ζώων

Η δοκιμασία πρέπει να σχεδιαστεί με προκαθαρισμένη ευαισθησία και ισχύ. Η παρατηρούμενη συχνότητα αυτόματης μετάλλαξης στον κατάλληλο μάρτυρα θα επηρεάσει σοβαρά τον αριθμό των χρωμοσωμάτων που πρέπει να αναλυθούν.

Οδός χορήγησης

Η έκθεση μπορεί να είναι από το στόμα, με ένεση ή με έκθεση σε αέρια ή ατμούς. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας μπορεί να διενεργηθεί σε σακχαροδιάλυμα. Όπου είναι αναγκαίο, οι ουσίες μπορεί να διαλυθούν σε διάλυμα NaCl 0,7% και να εισαχθούν με ένεση στο θώρακα ή στην κοιλιά.

Χρήση αρνητικών και θετικών δοκιμασιών με μάρτυρες

Θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται αρνητικές δοκιμασίες (με έκδοχα) καθώς και θετικές. Ωστόσο, εάν υπάρχουν ιστορικά εργαστηριακά δεδομένα ελέγχου, δεν χρειάζονται σύγχρονες δοκιμασίες με μάρτυρες.

Επίπεδο έκθεσης

Τρία επίπεδα έκθεσης θεωρούνται απαραίτητα. Για μια αρχική εκτίμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα επίπεδο έκθεσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, το οποίο μπορεί να είναι είτε η ανώτατη ανεκτή συγκέντρωση είτε εκείνη που παράγει κάποια ένδειξη τοξικότητας. Για τις μη τοξικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή συγκέντρωση.

Διαδικασία

Τα αρσενικά φυσικού (wild) τύπου (ηλικίας τριών έως πέντε ημερών) υφίστανται αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία και ζευγαρώνονται χωριστά με πλεόνασμα παρθένων θηλυκών της βασικής καλλιέργειας Muller-5 ή από άλλη κατάλληλη σημασμένη βασική καλλιέργεια (με πολλαπλά ανεστραμμένα Χ-χρωμοσώματα). Τα θηλυκά αντικαθίστανται με καινούργια παρθένα θηλυκά κάθε δύο ως τρεις ημέρες για την κάλυψη ολοκλήρου του κύκλου του γεννητικού κυττάρου. Οι απόγονοι των θηλυκών αυτών καταγράφονται για θανατηφόρες επιδράσεις σε σχέση με τις επιδράσεις στο ώριμο σπέρμα, στα σπερματίδια μέσης ή τελευταίας φάσης, στα πρώιμα σπερματίδια, στα σπερματοκύτταρα και στα σπερματογόνια, κατά τη διάρκεια αγωγής.

Τα ετερόζυγα θηλυκά F_1 των παραπάνω διασταυρώσεων επιτρέπεται να ζευγαρώσουν χωριστά (π.χ. ένα θηλυκό ανά φιαλίδιο) με τους αδελφούς τους. Στη γενεά F_2, σε κάθε καλλιέργεια καταγράφεται η απουσία αρσενικών φυσικού (wild) τύπου. Εάν μια καλλιέργεια εμφανίζεται να έχει προκύψει από ένα θηλυκό F_1 που έχει ένα θανατογόνο γονίδιο στο μητρικό Χ-χρωμόσωμα (π.χ. δεν παρατηρούνται καθόλου αρσενικά με το υφιστάμενο αγωγή χρωμόσωμα), οι θυγατέρες του θηλυκού αυτού με τον ίδιο γονότυπο θα πρέπει να εξετασθούν για να διαπιστωθεί εάν η θνησιμότητα επαναλαμβάνεται στην επόμενη γενεά.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα που να δείχνει τον αριθμό των Χ-χρωμοσωμάτων που εξετάσθηκαν, τον αριθμό των μη γόνιμων αρσενικών και τον αριθμό των θανατογόνων χρωμοσωμάτων σε κάθε συγκέντρωση έκθεσης και για κάθε περίοδο ζευγαρώματος, για κάθε αρσενικό που υπέστη αγωγή. Οι αριθμοί συσσωματωμάτων διαφορετικών μεγεθών ανά αρσενικό πρέπει να αναφέρονται. Τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με χωριστό πείραμα.

Για την αξιολόγηση των δοκιμασιών του τύπου αυτού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι. Η συσσωμάτωση (clustering) των θανατογόνων γονιδίων που προέρχονται από ένα αρσενικό πρέπει να εξετάζεται και να αξιολογείται με κατάλληλο στατιστικό τρόπο.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— βασική καλλιέργεια: βασικές καλλιέργειες Drosophila ή στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, ηλικία των εντόμων, αριθμός των αρσενικών που δέχθηκαν αγωγή, αριθμός στείρων αρσενικών, αριθμός καθορισμένων καλλιεργειών F_2, αριθμός καλλιεργειών F_2 χωρίς απογόνους, αριθμός χρωμοσωμάτων που φέρουν θανατογόνο γονίδιο που διαπιστώθηκε σε κάθε φάση του γαμετογόνου κυττάρου,

— κριτήρια για τον καθορισμό του μεγέθους των ομάδων που υπέστησαν αγωγή,

— συνθήκες της δοκιμασίας: λεπτομερής περιγραφή του προγράμματος αγωγής και δειγματοληψίας, επίπεδα έκθεσης, δεδομένα τοξικότητας, αρνητικοί έλεγχοι (διαλύτες) με μάρτυρες και θετικοί έλεγχοι, εάν υπάρχουν,

— κριτήρια για την καταγραφή των θανατηφόρων μεταλλάξεων,

— σχέση έκθεσης/αποτελέσματος, όπου είναι δυνατόν,

— αξιολόγηση των δεδομένων,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VITRO

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Συστήματα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση φαινοτυπικών μεταβολών in vitro που προκαλούνται από χημικές ουσίες που σχετίζονται με κακοήθη μετασχηματισμό in vivo. Ευρύτερα χρησιμοποιούμενα κύτταρα είναι τα C3H10T½, 3T3, SHE, αρουραίου Fisher και τα πειράματα βασίζονται στις μεταβολές της μορφολογίας των κυττάρων, στο σχηματισμό εστιών ή στις μεταβολές στην εξάρτηση στήριξης σε ημιστέρεη αγάρ αγάρ. Υπάρχουν και λιγότερο χρησιμοποιούμενα συστήματα, τα οποία ανιχνεύουν άλλες φυσιολογικές ή μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα μετά από έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες. Κανένα από τα τελικά σημεία του πειράματος in vitro δεν έχει αποδειγμένη μηχανιστική σχέση με τον καρκίνο. Μερικά από τα πειραματικά συστήματα μπορούν να ανιχνεύουν προαγωγείς όγκων. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση της επίδρασης του υλικού της δοκιμασίας σε αποικία η οποία διαμορφώνει ικανότητες (κλωνική επάρκεια) ή ρυθμούς ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας γίνεται για να αποδειχθεί ότι η έκθεση στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία ήταν τοξικολογικά σχετική αλλά ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συχνότητας μετασχηματισμού σε όλες τις δοκιμασίες λόγω του ότι μερικές μπορούν να αφορούν μακρόχρονη επώαση ή/και ανακαλλιέργεια σε τριβλίο.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Κύτταρα

Υπάρχει μια ποικιλία σειρών κυττάρων ή αρχέτυπων κυττάρων, ανάλογα με την εκτελούμενη δοκιμασία μετασχηματισμού. Ο ερευνητής πρέπει να βεβαιωθεί ότι τα κύτταρα στην εκτελούμενη δοκιμασία παρουσιάζουν την κατάλληλη φαινοτυπική μεταβολή μετά από έκθεση σε γνωστά καρκινογόνα και ότι η δοκιμασία, στο εργαστήριό του, είναι αποδειγμένης και τεκμηριωμένης αξίας και αξιοπιστίας.

Μέσον καλλιέργειας

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφυές μέσον και κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για την εκτέλεση της δοκιμασίας μετασχηματισμού.

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε υλικά καλλιέργειας ή να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση του εκδόχου στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του κυττάρου ή το ρυθμό ανάπτυξης ή τη συχνότητα εμφάνισης μετασχηματισμών.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Εναλλακτικά, όταν χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι, οι οποίοι διαθέτουν εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι γνωστό ότι είναι κατάλληλη στη δοκιμαζόμενη χημική κατηγορία.

Συνθηκες δοκιμασίας

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων (μάρτυρες)

Σε κάθε πείραμα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και θετικοί έλεγχοι, με τη χρήση μιας ένωσης άμεσης ενέργειας και μιας ένωσης που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται ένας αρνητικός έλεγχος (με έκδοχο).

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιων που θα μπορουσαν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί μάρτυρες:

— χημικές ουσίες άμεσης ενέργειας:
  — αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο,
  — β-προπιολακτόνη·
— ενώσεις που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση:
  — 2-ακετυλαμινοφλουορένιο,
  — 4-διμεθυλαμινοβενζόλιο,
  — 7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Όπου χρειάζεται, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται ένας πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας οπου ανήκει η δοκιμαζόμενη ένωση.

Συγκεντρώσεις έκθεσης

Χρησιμοποιουνται διάφορες συγκεντρώσεις της δοκιμαζομενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να δημιουργούν μια τοξική επίδραση ανάλογη με τη συγκέντρωση, και η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να παράγει χαμηλό επίπεδο επιβίωσης, ενώ η επιβίωση στη χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι κατά προσέγγιση η ίδια όπως και η επιβίωση στον αρνητικό μάρτυρα.

Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για εξαιρετικά υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατα περίπτωση.

Διαδικασία

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται για κατάλληλη χρονικη περίοδο, ανάλογα με το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιείται, το οποίο μπορει να περιλαμβάνει ανανέωση των δόσεων με αλλαγή και του μέσου (και αν είναι αναγκαίο, νέο μείγμα μεταβολικής ενεργοποιησης) στην περίπτωση παράτασης της έκθεσης. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριοτητα πρέπει να εκτιθενται στη δοκιμαζόμενη ουσια με και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικης ενεργοποίησης. Κατα το τελος της περιοδου έκθεσης τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθει η δοκιμαζόμενη ουσια και καλλιεργούνται υπο συνθηκες κατάλληλες για την εμφάνιση του παρακολουθούμενου μετασχηματισμένου φαινοτυπου και για τον καθορισμό της συχνότητας εμφάνισης μετασχηματισμών. Ολα τα αποτελεσματα επιβεβαιωνονται με ανεξάρτητο πειραμα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρεπει να παριστανται με μορφή πίνακα και να μπορούν να παιρνουν μια ποικιλια μορφών ανάλογα με το εκτελουμενο πείραμα (π.χ. μέτρηση καλλιεργειών μεσα σε αγαρ αγαρ, θετικές καλλιέργειες ή αριθμός μετασχηματισμένων κυτταρων). Όπου χρειάζεται, η επιβίωση πρέπει να εκφράζεται σαν ποσοστό των επιπέδων ουσίας ελέγχου και η συχνοτητα μετασχηματισμου να εκφραζεται σαν αριθμος των μετασχηματισμένων ανα αριθμό επιβιωσαντων.

Τα δεδομενα πρέπει να αξιολογουνται με τη χρήση καταλληλης στατιστικής μεθόδου.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Στην έκθεση της δοκιμασιας πρέπει να περιλαμβανονται οι παρακατω πληροφορίες:

— κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός καλλιεργειων κυττάρων, μεθοδοι συντήρησης της καλλιεργειας κυττάρων,
— συνθήκες διαδικασίας, συγκέντρωση της δοκιμαζομενης ουσίας, εκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, χρόνος επώασης, διάρκεια και συχνοτης αγωγής, πυκνοτητα κυττάρων κατά τη διαρκεια της αγωγής, τύπος χρησιμοποιούμενου συστήματος εξωγενούς μεταβολικης ενεργοποιησης, θετικοι και αρνητικοί έλεγχοι, προδιαγραφες του παρακολουθούμενου φαινοτύπου, επιλεγμενο συστημα που χρησιμοποιείται (εαν χρειαζεται), αιτιολογηση της επιλογης δοσεων,

— χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απαρίθμηση των βιώσιμων και μετασχηματισμένων κυττάρων,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Οι επιδράσεις του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος προκαλούν εμβρυικούς θανάτους. Η επαγωγή θανατηφόρων επικρατούντων χαρακτήρων με έκθεση σε χημική ουσία δείχνει ότι η ουσία επηρέασε τον σπερμικό ιστό των πειραματόζωων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι θανατηφόροι επικρατούντες χαρακτήρες οφείλονται σε χρωμοσωμική βλάβη (δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες). Εάν η αγωγή παρέχεται στα θηλυκά, ο εμβρυϊκός θάνατος μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα τοξικών επιδράσεων. Γενικά, τα αρσενικά ζώα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία και ζευγαρώνονται με παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή. Οι διάφορες φάσεις των γαμετογόνων κυττάρων μπορούν να ελεγχθούν με αλληλοδιάδοχα διαστήματα ζευγαρώματος. Η αύξηση των νεκρών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με τα νεκρά εμφυτεύματα ανά θηλυκό στην ομάδα μάρτυρα αντανακλά την μετα-εμφυτευματική απώλεια. Η προ-εμφυτευματική απώλεια μπορεί να εκτιμηθεί με βάση τους αριθμούς των ωχρών σωματίων η με σύγκριση των συνολικών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα που έχει υποστεί αγωγή και στην ομάδα ελέγχου. Η συνολική επίδραση του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος είναι το άθροισμα της προ- και μετα-εμφυτευματικής απώλειας. Ο υπολογισμός της συνολικής επίδρασης του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος βασίζεται στη σύγκριση των ζωντανών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα δοκιμασίας προς τα ζωντανά εμφυτεύματα ανά θηλυκό ζωο στην ομάδα μαρτύρων. Η μείωση του αριθμού των εμφυτευμάτων σε ορισμένα διαστήματα μπορεί να είναι αποτέλεσμα θανάτωσης κυττάρων (π.χ. σπερματοκυττάρων η/και σπερματογονίων).

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει όπου είναι δυνατό να διαλύονται η να εναιωρούνται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Χημικές ουσίες με υδατοδιάλυτες μπορούν να διαλυθούν η να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα. Το χρησιμοποιούμενο έκδοχο πρέπει να μην αντιδρά με την πειραματική χημική ουσία ούτε να παράγει τοξικές επιδράσεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας.

Συνθήκες δοκιμασίας

Οδός χορήγησης

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει γενικά να χορηγείται εφάπαξ. Με βάση τις τοξικολογικές πληροφορίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρόγραμμα επαναλαμβανόμενης αγωγής. Οι συνηθισμένες οδοί χορήγησης είναι η εισαγωγή από το στόμα ή η ενδοπεριτονική ένεση. Καταλληλες μπορεί να είναι και άλλες οδοί χορήγησης.

Πειραματόζωα

Οι αρουραίοι ή οι ποντικοί συνιστωνται σαν πειραματικό είδος. Γίνεται τυχαία επιλογή σε υγιή ζωα πλήρους σεξουαλικής ωριμότητας, τα οποία τοποθετούνται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων για αγωγή, λαμβανομένης υπόψη της αυτογενούς μεταβολής του εκτιμώμενου βιολογικού χαρακτήρα. Ο αριθμός των επιλεγέντων ζώων πρέπει να βασίζεται στην προκαθορισμένη ευαισθησία ανίχνευσης και στο βαθμό σημαντικότητας. Για παράδειγμα, σε ένα τυπικό πείραμα, ο αριθμός των αρσενικών σε κάθε ομάδα δόσης πρέπει να είναι επαρκής για να δημιουργεί 30 έως 50 έγκυα θηλυκά ανά διάστημα ζευγαρώματος.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων (μαρτυρες)

Σε καθε πείραμα πρέπει συγχρόνως να γίνονται θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι (μάρτυρες). Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών ελέγχων από πρόσφατα πειραματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθουν αντί ενός σύγχρονου θετικού ελέγχου. Οι ουσιες θετικού ελέγχου πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κατάλληλη χαμηλή δόση (π.χ. MMS, ενδοπεριτονιακά, σε 10 mg/kg) για την απόδειξη της ευαισθησίας της δοκιμασίας.

Επίπεδα δόσεων

Κανονικά πρεπει να χρησιμοποιούνται τρια επιπεδα δόσεων. Η υψηλή δόση πρέπει να παράγει σημεία τοξικότητας ή μειωμένη γονιμότητα στα ζώα που υφίστανται την αγωγή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα μόνο επίπεδο υψηλής δόσης μπορεί να είναι επαρκές.

Οριακή δοκιμασία

Οι μη τοξικές ουσίες πρέπει να δοκιμαζονται σε 5 g/kg με εφάπαξ χορήγηση, ή σε 1 g/kg ανά ημέρα με επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Διαδικασία

Διατίθενται διάφορα προγράμματα αγωγής. Η εφαπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτατα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αλλα προγράμματα αγωγης.

Κάθε ένα από τα αρσενικά ζευγαρώνεται αλληλοδιάδοχα με ένα ή δύο παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή, σε κατάλληλα διαστήματα μετα την αγωγη. Τα θηλυκά πρέπει να αφεθούν με τα αρσενικά κατά τη διάρκεια ενός τουλάχιστον οιστρικού κύκλου ή μέχρι να επιτευχθεί το ζευγάρωμα που διαπιστώνεται από την παρουσία του σπέρματος στον κόλπο ή απο την παρουσια βύσματος από πηγμένο σπέρμα στον κολπο.

Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετα την αγωγη διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και θα πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων απο όλες τις φάσεις του γαμετογόνου κυτταρου μετα την αγωγη.

Τα θηλυκά θανατώνονται κατά το δεύτερο ημισυ της εγκυμοσύνης και το περιεχόμενο της μήτρας εξετάζεται για τον προσδιορισμο του αριθμού των νεκρών και ζωντανών εμφυτευμάτων. Οι ωοθήκες μπορούν να εξετασθούν για τον προσδιορισμό του αριθμου των ωχρών σωματιων.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφη πινακα για να δείχνουν τον αριθμο των αρσενικών, τον αριθμό των εγκύων θηλυκών και τον αριθμό των μη εγκύων θηλυκών ζώων. Τα αποτελέσματα καθε ζευγαρώματος, συμπεριλαμβανομένης της ταυτότητας κάθε αρσενικου και θηλυκού, πρέπει να εκτίθενται χωριστά.

Για κάθε θηλυκό πρέπει να αναφέρεται η εβδομαδα ζευγαρώματος και για τα αρσενικά το επίπεδο δόσης, και να καταγράφονται οι συχνοτητες των ζωντανών εμφυτευμάτων.

Ο υπολογισμός της συνολικης επίδρασης του θανατηφόρου επικρατουντος χαρακτήρος βασίζεται στη σύγκριση των ζωντανών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομαδα δοκιμασίας προς τα ζωντανά εμφυτεύματα ανά θηλυκό στην ομάδα μαρτυρα. Η σχέση των νεκρων προς τα ζωντανα εμφυτευματα από την ομάδα που υφίσταται αγωγή συγκρινόμενη προς την ίδια σχέση της ομάδας μαρτυρα αναλύεται για να προκύψει η μετεμφυτευματική απώλεια.

Εάν τα δεδομένα καταγράφονται σαν πρωιμοι και καθυστερημένοι θάνατοι, αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί στους πίνακες. Πρεπει να αφαιρεθεί, εάν έχει εκτιμηθεί η προ-εμφυτευματική απώλεια. Η προ-εμφυτευματική απώλεια μπορεί να υπολογιστεί σαν διαφορά μεταξυ του αριθμού των ωχρών σωματίων και του αριθμού των εμφυτευμάτων ή σαν μείωση του μέσου αριθμού των εμφυτευματων ανα μητρα σε σύγκριση με τα ζευγαρώματα μαρτύρων.

Τα δεδομενα αξιολογουνται με καταλληλες στατιστικες μεθοδους.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— είδος, στέλεχος, ηλικία και βάρος των χρησιμοποιούμενων ζώων, αριθμός των ζώων ανά φύλο στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα ελέγχου,

— δοκιμαζόμενη ουσία, έκδοχο, δοκιμαζόμενο επίπεδο δόσης και αιτιολόγηση της επιλογής δόσεων, αρνητικοί και θετικοί έλεγχοι, δεδομένα τοξικότητας,

— οδός και διάρκεια έκθεσης,

— πρόγραμμα ζευγαρώματος,

— μέθοδος για την διαπίστωση του ζευγαρώματος,

— χρόνος θανάτωσης,

— κριτήρια για την καταγραφή του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος,

— σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν είναι δυνατόν,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΟΥ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Στην δοκιμασία αυτή κυτταρογενετικής in vivo ανιχνεύονται οι δομικές αποκλίσεις χρωμοσωμάτων στη σπερματογονία. Αποτελείται από ανάλυση της σπερματογονικής μίτωσης για αποκλίσεις τύπου χρωματιδίων και χρωμοσωμάτων.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί παρασκευάσματα όρχεων θηλαστικών τα οποία εκτίθενται στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες με κατάλληλο τρόπο και θανατώνονται σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα ζώα έπειτα υφίστανται αγωγή, πριν από τη θανάτωση, με αναστολείς ατράκτου όπως είναι η κολχικίνη για τη συσσώρευση κυττάρων σε ένα μεταφασικό στάδιο μίτωσης (c-μετάφαση). Γίνονται παρασκευάσματα αποξηραμμένων με αέρα χρωμοσωμάτων, χρωματίζονται και αναλύονται μικροσκοπικά.

Η ανάλυση των σπερμοκυττάρων στη διακίνηση-μετάφαση Ι για τη μετατόπιση των πολυσθενών, μετά την αγωγή των σπερματογόνων στελεχιαίων κυττάρων, μπορεί να δώσει χρήσιμες πρόσθετες πληροφορίες.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.5. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασιάς

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες διαλύονται σε ισοτονικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Εάν είναι αδιάλυτες τότε διαλύονται ή εναιωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη διευκόλυνση της λήψης πρέπει να μην αντιδρά με την δοκιμαζόμενη χημική ουσία ή να μην προκαλεί τοξικές επιδράσεις.

Οδός χορήγησης

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει γενικά να χορηγούνται εφαπαξ. Με βάση τοξικολογικές πληροφορίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρόγραμμα επαναλαμβανόμενης αγωγής. Ωστόσο, η επαναλαμβανόμενη αγωγή μπορεί μόνο να εφαρμοστεί εάν η δοκιμαζόμενη ουσια δεν παρουσιάζει σημαντικές κυτταροτοξικες επιδράσεις στη διαφοροποιούμενη σπερματογονία.

Οι συνήθεις οδοί χορηγησης είναι από το στόμα και με ενδοπεριτοναικες ενέσεις. Μπορεί να είναι κατάλληλες και άλλες οδοι χορήγησης.

Πειραματόζωα

Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται οι ποντικοί και οι κινέζικοι κρικητοί (chinese hamsters). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη θηλαστικών ζώων.

Χρησιμοποιούνται υγιή αρσενικά ζώα σεξουαλικά ώριμα και γίνεται τυχαία τοποθέτηση τους σε ομάδες αγωγής και ελέγχου.

Αριθμός ζώων

Χρησιμοποιούνται πέντε (5) τουλάχιστον αρσενικά ανά πειραματική ομάδα και ομάδα μαρτύρων.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Σε κάθε δοκιμασία να περιλαμβάνονται συγχρόνως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.

Οι ουσίες του θετικού μάρτυρα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κατάλληλα χαμηλή δόση (π.χ. μιτομυκίνη C, ενδοπεριτονιακά, σε 0.3 mg/kg) για την απόδειξη της ευαισθησίας της δοκιμασίας.

Επίπεδα δόσεων

Χρησιμοποιείται μια δόση της δοκιμαζόμενης ουσίας (η ανώτατη ανεκτή δόση ή εκείνη που παράγει κάποια ένδειξη κυτταροτοξικότητας). Εάν η δόση αυτή δημιουργεί υψηλό βαθμό θανάτου κυττάρων τότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί πρόσθετα μία χαμηλότερη δόση που να εμφανίζει κυτταροτοξικότητα. Όταν είναι αναγκαίο να διαπιστωθεί μία συσχέτιση δόσης/αποτελέσματος, απαιτούνται τρεις τουλάχιστον δόσεις (π.χ. για την επιβεβαίωση ενός ασθενούς θετικού αποτελέσματος. Οι μη τοξικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται στην υψηλότερη δυνατή δόση εφάπαξ και με επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Διαδικασία

Τα ζώα υφίστανται γενικά αγωγή μόνο μία φορά με την δοκιμαζόμενη ουσία. Στην ομάδα υψηλότερης δόσης χρησιμοποιούνται τρία διαστήματα δειγματοληψίας μετά από την αγωγή. Το κεντρικό διάστημα δειγματοληψίας είναι 24 ώρες. Επειδή η κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επηρεαστεί από τη δοκιμαζόμενη ουσία, εφαρμόζονται ένα πρώιμο και ένα καθυστερημένο διάστημα δειγματοληψίας, επαρκώς κατανεμημένα μέσα στο διάστημα των 48 ωρών. Για πρόσθετα επίπεδα δόσεων, τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται στο ιδιαίτερα ευαίσθητο διάστημα των 6 έως 48 ωρών. Για προσθετα επίπεδα δόσεων, τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται στο ιδιαίτερα ευαίσθητο διάστημα η, εάν αυτό δεν είναι γνωστό, 24 ώρες μετά την αγωγή.

Εναλλακτικά μπορεί να εφαρμοσθεί ένα πρόγραμμα επαναλαμβανομένων επεμβάσεων και τα ζώα να θανατωθούν 24 ώρες μετά τη τελευταία επέμβαση. Πρόσθετοι χρόνοι δειγματοληψίας μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο διάστημα από 6 έως 24 ώρες.

Προετοιμασία του δείγματος

Για την ανάλυση της σπερματογονικής μίτωσης, τα ζώα δέχονται ενδοπεριτονιακή ένεση με επαρκή δόση αναστολέων ατράκτου όπως είναι η κολχικίνη. Τα ζώα θανατώνονται σε κατάλληλο χρονικό διάστημα από την αγωγή. Για τους ποντικούς, το διάστημα αυτό ποικίλλει από τρεις έως πέντε ώρες, για τους κινέζικους κρικητούς (chinese hamsters) μπορεί να απαιτηθούν περισσότερο από πέντε ώρες.

Χρησιμοποιείται η τεχνική της αφυδάτωσης με τη βοήθεια του αέρα. Διάφορα είδη ζώων μπορεί να απαιτούν τροποποίηση της πρότυπης διαδικασίας. Λαμβάνονται εναιωρήματα κυττάρων, τα οποία υφίστανται αγωγή με υποτονικό διάλυμα και σταθεροποιουνται. Τα κύτταρα απλώνονται πάνω σε πλακίδια και χρωματίζονται. Τα πλακίδια κωδικοποιούνται πριν από τη μικροσκοπική ανάλυση.

Ανάλυση

100 τουλάχιστον καλά κατανεμημένες μιτωτικές μεταφασεις με τον πλήρη αριθμό των κεντρομεριδίων αναλύονται για δομικές αποκλίσεις χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, η αναλογία της σπερματογονικής μίτωσης στην πρώτη και στη δεύτερη μειωτική μετάφαση μπορούν καθοριστούν σε ένα συνολικό δείγμα 100 διαιρουμένων κυττάρων ανά ζώο για τη διαπίστωση της πιθανής κυτταροτοξικής επίδρασης.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρίστανται με μορφή πινακα. Όλοι οι τύποι των αποκλίσεων καταγράφονται χωριστά για τους μάρτυρες και για τα ζώα που υφίστανται αγωγή. Περιλαμβάνεται ο συνολικός αριθμός των αναλυθέντων κυττάρων και ο συνολικός αριθμός των αποκλινόντων κυττάρων ανά ομάδα. Μέσοι όροι και μέση απόκλιση δίνονται για όλες τις παραμέτρους. Η μέση αναλογία της σπερματογονικής μίτωσης στην πρώτη και στη δεύτερη μειωτική μετάφαση παρίσταται σε πίνακα για κάθε ομάδα του πειράματος και για κάθε ομάδα μαρτύρων.

Τα δεδομένα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθοδους.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— είδος, στέλεχος, ηλικία και βάρος αρσενικών ζώων,

— αριθμός ζώων για κάθε ομάδα δοκιμασίας και για κάθε ομάδα μάρτυρα,

— συνθήκες της δοκιμασίας, λεπτομερής περιγραφή της αγωγής, επίπεδα δόσεων, αναστολέας ατράκτου που χρησιμοποιήθηκε,

— αριθμός αναλυθέντων κυττάρων ανά ζώο σε κάθε ομάδα,

— τύποι και αριθμοί αποκλίσεων χωριστά για κάθε ζώο αγωγής και για κάθε ζώο του μάρτυρα,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΗΛΙΔΑΣ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Πρόκειται για μια δοκιμασία in vivo σε ποντικούς στους οποίους τα αναπτυσσόμενα έμβρυα εκτίθενται στις χημικές ουσίες. Τα κύτταρα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης στα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι οι μελανοβλάστες, τα δε γονίδια που αποτελούν στόχο του πειράματος είναι εκείνα που ελέγχουν τη χρώση του τριχώματος. Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι ετερόζυγα για ορισμένο αριθμό αυτών των γονιδίων χρώσης του τριχώματος. Μετάλλαξη ή απώλεια του επικρατούς αλληλόμορφου ενός τέτοιου γονιδίου σε μελανοβλάστη έχει σαν αποτέλεσμα, την έκφραση του υπολειπομένου φαινοτύπου στα κατιόντα κύτταρά του που συνίσταται από μια κηλίδα μεταβληθέντος χρώματος στο τρίχωμα του προκύπτοντος ποντικού. Ο αριθμός των απογόνων με τέτοιες κηλίδες και μεταλλάξεις καταγράφεται και η συχνότητά τους συγκρίνεται με εκείνη μεταξύ των απογόνων που προκύπτουν από έμβρυα τα οποία υπέστησαν αγωγή μόνο με το διαλύτη. Η δοκιμασία κηλίδας σε ποντικό ανιχνεύει υποτιθέμενες σωματικές μεταλλάξεις σε εμβρυϊκά κύτταρα.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Όπου είναι δυνατόν, οι δοκιμαζόμενες ουσίες διαλύονται ή εναιωρούνται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Οι χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό διαλύονται ή εναιωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Το χρησιμοποιούμενο έκδοχο δεν πρέπει ούτε να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη χημική ουσία ούτε να παράγει τοξικές επιδράσεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας.

Πειραματόζωα

Οι ποντικοί του στελέχους T (nonagouti a/a· chinchilla, pink eye, c^{ch} p/c^{ch} p; brown, b/b, dilute, short ear, d se/d se· piebald spotting, s/s) ζευγαρώνονται είτε με ποικιλία στελέχους HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp· leaden fuzzy, ln fz/ln fz· pearl pe/pe) ή με C 57 BL (nonagouti, a/a). Άλλες κατάλληλες διασταυρώσεις όπως είναι μεταξύ NMRI (nonagouti, a/a· albino c/c) και DBA (nonagouti, a/a· brown b/b· dilute d/d) μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκεί να παράγουν απογόνους nonagouti.

Αριθμός και φύλο

Επαρκής αριθμός εγκύων θηλυκών ζώων υφίστανται αγωγή για να υπάρξει κατάλληλος αριθμός επιζώντων απογόνων για κάθε χρησιμοποιούμενο επίπεδο δόσης. Το κατάλληλο μέγεθος δείγματος διέπεται από τον αριθμό των κηλίδων που παρατηρούνται στους ποντικούς που υφίστανται αγωγή και από την κλίμακα των δεδομένων του μάρτυρα. Αρνητικό αποτέλεσμα είναι αποδεκτό μόνο όταν καταγράφηκαν 300 τουλάχιστον απόγονοι από θηλυκά που υπέστησαν αγωγή με την υψηλότερη δόση.

Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι με μάρτυρες

Συγχρόνως με τη δοκιμασία πρέπει να γίνονται έλεγχοι με ποντικούς που υπέστησαν αγωγή μόνο με το έκδοχο (αρνητικοί έλεγχοι). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο για την αύξηση της ευαισθησίας της δοκιμασίας, υπό τον όρο ότι τα δεδομένα θα είναι ομογενή. Εάν η δοκιμαζόμενη χημική

ουσία δεν δείχνει καθόλου μεταλλαξιογενετικότητα, πρέπει να διατίθενται συγκρίσιμα δεδομένα θετικού ελέγχου, τα οποία έχουν ληφθεί πρόσφατα στο ίδιο εργαστήριο, από την αγωγή με μια χημική ουσία η οποία να είναι γνωστό ότι παρουσιάζει μεταλλαξιογενετικότητα στη δοκιμασία αυτή.

Οδός χορήγησης

Οι συνήθεις οδοί χορήγησης είναι ο καθετηριασμός από το στόμα και η ενδοπεριτονιακή ένεση των εγκύων θηλυκών. Η αγωγή με εισπνοή ή με άλλες οδούς χορήγησης χρησιμοποιείται, όταν είναι δυνατόν.

Επίπεδα δόσεων

Δύο τουλάχιστον επίπεδα δόσεων χρησιμοποιούνται, συμπεριλαμβανομένου ενός επιπέδου που δείχνει σημεία τοξικότητας ή μειωμένο αριθμό εμβρύων της ίδιας μητέρας. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιείται η έκθεση στην ανώτατη πρακτικά δυνατή δόση.

Διαδικασία

Μία μοναδική αγωγή εφαρμόζεται κανονικά την όγδοη, ένατη και δέκατη ημέρα της εγκυμοσύνης, λαμβανομένης υπόψη σαν ημέρας 1 της ημέρας κατά την οποία παρατηρείται για πρώτη φορά το πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Οι ημέρες αυτές αντιστοιχούν στις ημέρες 7,25, 8,25 και 9,25 μετά τη σύλληψη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαδοχικές αγωγές μετά από αυτές τις ημέρες.

Ανάλυση

Οι απόγονοι κωδικοποιούνται και καταγράφονται για χρωματιστές κηλίδες μετά τρεις και τέσσερις εβδομάδες από τη γέννηση. Διακρίνονται τρεις κλάσεις κηλίδων:

α) λευκές κηλίδες εντός 5 mm από την ημικοιλιακή γραμμή που υποτίθεται ότι προκύπτουν από τη θανάτωση κυττάρων (WMVS)·

β) κίτρινες, που ομοιάζουν με φαιές (agouti-like), κηλίδες που σχετίζονται με τους μαστούς, το λαιμό, τις μασχαλιαίες και βουβωνικές χώρες και το μέτωπο, οι οποίες υποτίθεται ότι προκύπτουν από κακή διαφοροποίηση των κυττάρων (misdifferentiation) (MDS)·

γ) χρωματιστές και λευκές κηλίδες, τυχαία κατανεμημένες πάνω στο τρίχωμα, που υποτίθεται ότι προκύπτουν από σωματικές μεταλλάξεις (RS).

Και οι τρεις κλάσεις καταγράφονται, αλλά μόνο η τελευταία (RS) έχει γενετική σημασία. Τα προβλήματα της διάκρισης μεταξύ των κηλίδων MDS και RS μπορούν να επιλυθούν με φθορίζουσα μικροσκοπική εξέταση δείγματος του τριχώματος. Οι μακροσκοπικά εμφανείς μορφολογικές ανωμαλίες των απογόνων πρέπει να σημειωθούν.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα παρίστανται σαν συνολικός αριθμός καταγραφέντων απογόνων, και σαν αριθμός ζώων που έχουν μια ή περισσότερες κηλίδες υποτιθέμενης σωματικής μετάλλαξης. Τα δεδομένα της αγωγής και του αρνητικού ελέγχου συγκρίνονται χρησιμοποιώντας στατιστικές μεθόδους.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διασταύρωση,

— αριθμός εγκύων θηλυκών στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα μάρτυρα,

— μέσος αριθμός γεογνών κατά μητέρα στις ομάδες δοκιμασίας και στις ομάδες μάρτυρες κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό,

— επίπεδα δόσεων της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας,

— διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε,

— ημέρα εγκυμοσύνης κατά την οποία διενεργήθηκε η χορήγηση,

— οδός χορήγησης,

— συνολικός αριθμός καταγραφέντων απογόνων και αριθμός με WMVS, MDS και RS στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα μάρτυρα,

— μακροσκοπικές μορφολογικές ανωμαλίες,

— σχέση δόσης/αποτελέσματος των RS, όπου είναι δυνατόν,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η δοκιμασία κληρονομήσιμης μετατόπισης γονιδίων σε ποντικούς ανιχνεύει τις δομικές και αριθμητικές μεταβολές χρωμοσωμάτων σε γεννητικά κύτταρα θηλαστικών που ανακαλύπτονται στους απογόνους της πρώτης γενεάς. Οι τύποι των μεταβολών χρωμοσωμάτων είναι αντίστοιχες μετατοπίσεις και, στην περίπτωση που συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι, απώλεια Χ-χρωμοσωμάτων. Οι φορείς των μετατοπίσεων και ΧΟ-θηλυκά δείχνουν μειωμένη γονιμότητα και συνηθίζεται να επιλέγονται οι απόγονοι F_1 για κυτταρογενετική ανάλυση. Πλήρης στειρότητα προκαλείται από ορισμένους τύπους μετατοπίσεων (τύπου Χ-αυτοσωματικό και c-t). Οι μετατοπίσεις παρατηρούνται κυτταρογενετικά στα μειωτικά κύτταρα στη διακίνηση-μετάφαση I των αρσενικών ατόμων, είτε στα αρσενικά της ομάδας F_1 είτε στους υιούς των θηλυκών της ομάδας F_1. Τα θηλυκά ΧΟ διαπιστώνονται κυτταρογενετικά από την παρουσία 39 μόνο χρωμοσωμάτων στις μιτώσεις του μυελού οστών.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες διαλύονται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Εάν είναι αδιάλυτες, τότε διαλύονται ή εναιωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη διευκόλυνση της λήψης, δεν πρέπει να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη ουσία ή να προκαλεί τοξικές επιδράσεις.

Οδός χορήγησης

Σαν οδοί χορήγησης συνήθως χρησιμοποιούνται ο καθετηριασμός από το στόμα ή η ενδοπεριτοναική ένεση. Και άλλες οδοί χορήγησης μπορεί να είναι κατάλληλες.

Πειραματόζωα

Για τη διευκόλυνση της αναπαραγωγής και της κυτταρολογικής επαλήθευσης, τα πειράματα αυτά εκτελούνται με ποντικούς. Δεν απαιτείται ιδιαίτερο στέλεχος ποντικών. Ωστόσο ο μέσος αριθμός εμβρύων από την έγκυο μητέρα της ποικιλίας που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι μεγαλύτερος από οκτώ και θα πρέπει να είναι σχετικά σταθερός. Χρησιμοποιούνται υγιή, σεξουαλικά ώριμα ζώα.

Αριθμός ζώων

Ο αριθμός των αναγκαίων ζώων εξαρτάται από τη συχνότητα αυθόρμητης μετατόπισης και από τον ελάχιστο ρυθμό επαγωγής που απαιτείται για την επίτευξη θετικού αποτελέσματος.

Το πείραμα εκτελείται συνήθως με ανάλυση των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_1. 500 τουλάχιστον αρσενικοί απόγονοι της ομάδας F_1 πρέπει να περιληφθούν σε κάθε ομάδα δόσης. Εάν συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_1, απαιτούνται 300 αρσενικά και 300 θηλυκά.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να υπάρχουν επαρκή δεδομένα μαρτύρων, εξαγόμενα τόσο από τη δοκιμασία όσο και από ιστορικά στοιχεία. Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων από πρόσφατα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αντικαταστήσουν τη σύγχρονη χρήση θετικών μαρτύρων.

Επίπεδο δόσεων

Χρησιμοποιείται ένα επίπεδο δόσης, συνηθέστερα η υψηλότερη δόση που συνδέεται με την παραγωγή ελάχιστων τοξικών επιδράσεων αλλά χωρίς να επηρεάζει την αναπαραγωγική συμπεριφορά ή την επιβίωση. Για τον καθορισμό της σχέσης δόσης/αποτελέσματος απαιτούνται δύο πρόσθετες χαμηλότερες δόσεις. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή δόση.

Διαδικασία

Αγωγή και ζευγάρωμα

Δύο προγράμματα αγωγής υπάρχουν. Η εφάπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτερα. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας επί 35 ημέρες με βάση την εβδομάδα επτά ημερών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων από όλες τις φάσεις των γεννητικών κυττάρων που υφίστανται την αγωγή. Κατά το τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος, τα θηλυκά τοποθετούνται σε κλωβούς χωριστά. Όταν τα θηλυκά γεννήσουν, καταγράφεται η ημερομηνία, ο αριθμός των νεογνών και το φύλο τους. Όλοι οι αρσενικοί απόγονοι απογαλακτίζονται ενώ οι θηλυκές απόγονοι απορρίπτονται, εκτός εάν συμπεριλαμβάνονται στο πείραμα.

Δοκιμασία για ετεροζυγωτικότητα μετατόπισης

Χρησιμοποιείται μία από τις δύο δυνατές μεθόδους:

— Δοκιμασία γονιμότητας των απογόνων της ομάδας F_1 και μετέπειτα επαλήθευση των πιθανών φορέων μετατόπισης με κυτταρογενετική ανάλυση.

— Κυτταρογενετική ανάλυση όλων των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_1 χωρίς προηγούμενη επιλογή με τεστ γονιμότητας.

α) Δοκιμασία γονιμότητας

Η μειωμένη γονιμότητα ενός ζώου της ομάδας F_1 μπορεί να προσδιοριστεί με την παρατήρηση του αριθμού των νεογνών ή/και την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που έχουν ζευγαρώσει.

Τα κριτήρια προσδιορισμού της κανονικής και μειωμένης γονιμότητας καθορίζονται για το στέλεχος ποντικών που χρησιμοποιείται.

Παρατήρηση του αριθμού των νεογνών από την ίδια μητέρα: Τα αρσενικά της ομάδας F_1 που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία τοποθετούνται χωριστά σε κλωβούς με θηλυκά είτε από το ίδιο πείραμα είτε από την αποικία. Οι κλωβοί επιθεωρούνται καθημερινά, αρχίζοντας 18 ημέρες μετά το ζευγάρωμα. Ο αριθμός των νεογνών από την ίδια μητέρα και το φύλο των απογόνων της ομάδας F_2 καταγράφονται κατά τη γέννηση και εν συνεχεία τα νεογνά απορρίπτονται. Εάν εξετάζονται οι θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_1, οι απόγονοι F_2 των μικρών νεογνών διατηρούνται για παραπέρα δοκιμασία. Οι θηλυκοί φορείς μετατόπισης επαληθεύονται με κυτταρογενετική ανάλυση μετατόπισης σε οποιονδήποτε από τους αρσενικούς απογόνους τους. Τα θηλυκά ΧΟ αναγνωρίζονται από τη μεταβολή στην αναλογία φύλου μεταξύ των απογόνων τους από 1:1 έως 1:2 αρσενικά προς θηλυκά. Σε μία αλληλοδιάδοχη διαδικασία, τα κανονικά ζώα F_1 απομακρύνονται από παραπέρα δοκιμασία εάν η πρώτη ομάδα νεογνών από την ίδια μητέρα F_2 φθάσει ή υπερβεί την προκαθορισμένη κανονική τιμή, αλλιώς παρατηρείται μία δεύτερη ή τρίτη ομάδα νεογνών F_2 από την ίδια μητέρα.

Τα ζώα της ομάδας F_1 που δεν μπορούν να χαρακτηριστούν κανονικά μετά από παρατήρηση μέχρι τριών ομάδων νεογνών F_2, δοκιμάζονται παραπέρα με ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που υπέστησαν αγωγή ή με απευθείας υποβολή σε κυτταρογενετική ανάλυση.

Ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας: Η μείωση στον αριθμό νεογνών των φορέων μετατόπισης οφείλεται σε εμβρυϊκό θάνατο έτσι ώστε ένας υψηλός αριθμός νεκρών εμφυτευμάτων είναι ενδεικτικός για την παρουσία μετατόπισης στο δοκιμαζόμενο ζώο. Τα αρσενικά της ομάδας δοκιμής F_1, ζευγαρώνονται με δύο έως τρία θηλυκά το καθένα. Η σύλληψη προσδιορίζεται με καθημερινή επιθεώρηση για την εύρεση πηγμένου σπέρματος μέσα στον κόλπο το πρωί. Τα θηλυκά θανατώνονται μετά από 14 έως 16 ημέρες και καταγράφονται τα ζωντανά και νεκρά εμφυτεύματα μέσα στη μήτρα τους.

β) Κυτταρογενετική ανάλυση

Ετοιμάζονται παρασκευάσματα όρχεων με τη μέθοδο αφυδάτωσης, με τη βοήθεια του αέρα. Οι φορείς μετατόπισης τακτοποιούνται από την παρουσία πολυσθενών διατάξεων στη διακίνηση-μετάφαση I στα αρχέτυπα σπερματοκύτταρα. Η παρατήρηση δύο τουλάχιστον κυττάρων με πολυσθενή σύνδεσμο συνιστά την απαιτούμενη απόδειξη ότι το δοκιμασθέν ζώο είναι φορέας μετατόπισης.

Εάν δεν έχει γίνει επιλογή ζευγαρώματος όλα τα αρσενικά της ομάδας F_1 επιθεωρούνται κυτταρογενετικά. Πρέπει να καταγραφεί μικροσκοπικά ένας ελάχιστος αριθμός 25 διακινήσεων-μεταφάσεων I ανά αρσενικό. Η εξέταση των μιτωτικών μεταφάσεων, της σπερματογονίας ή του μυελού οστών απαιτείται για τα αρσενικά της ομάδας F_1 με μικρούς όρχεις και μειωτικό διαχωρισμό πριν τη διακίνηση ή από θηλυκά XO της ομάδας F_1 για τα οποία υπάρχει σχετική υποψία. Η παρουσία ασυνήθιστα μακρού ή/και βραχέος χρωμοσώματος σε κάθε ένα από τα δέκα κύτταρα αποτελεί απόδειξη ιδιαίτερης στειρωτικής μετατόπισης αρσενικού (c-t type). Μερικές μετατοπίσεις Χ-αυτοσωμικών που προκαλούν στειρότητα αρσενικών μπορεί να προσδιοριστούν μόνο με τη μέθοδο ζωνώσεως (banding) με μελέτη των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Η παρουσία 39 χρωμοσωμάτων και στις δέκα μιτώσεις αποτελεί απόδειξη της κατάστασης XO σε ένα θηλυκό.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα και η σχέση φύλου από μητρικά ζευγαρώματα κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό αναφέρονται για κάθε χρονικό διάστημα ζευγαρώματος.

Για την εκτίμηση της γονιμότητας των ζώων της ομάδας F_1 δίνονται ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα όλων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ομάδων νεογνών F_1 από την ίδια μητέρα των φορέων μετατόπισης. Για την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας δίνεται ο μέσος αριθμός των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων για κάθε ζευγάρωμα των φορέων μετατόπισης της ομάδας F_1.

Για την κυτταρογενετική ανάλυση της διακίνησης-μετάφασης I καταγράφονται οι αριθμοί των τύπων των πολυσθενών διατάξεων και ο συνολικός αριθμός κυττάρων για κάθε φορέα μετατόπισης.

Για τα στείρα ζώα της ομάδας F_1 αναγράφεται ο συνολικός αριθμός των ζευγαρωμάτων και η διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος.

Δίνονται τα βάρη των όρχεων και οι λεπτομέρειες της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Για τα θηλυκά της ομάδας XO, αναφέρεται ο μέσος αριθμός νεογνών από την ίδια μητέρα, η αναλογία φύλου των απογόνων της ομάδας F_2 και τα αποτελέσματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Εάν οι πιθανοί φορείς μετατόπισης της ομάδας F_1 προεπιλέγονται με δοκιμασίες γονιμότητας, οι πίνακες πρέπει να περιλαμβάνουν πληροφορίες για τον αριθμό εκείνων που επιβεβαιώθηκαν ότι είναι ετεροζυγώτες μετατόπισης. Τα δεδομένα από πειράματα αρνητικών ελέγχων και θετικών ελέγχων με μάρτυρες αναφέρονται κατά τον ίδιο τρόπο.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

— στελέχη των ποντικών, ηλικία των ζώων, βάρη των ζώων που υπέστησαν την αγωγή,

— αριθμοί των μητρικών ζώων κάθε φύλου της ομάδας δοκιμασίας και της ομάδας μάρτυρα,

— συνθήκες της δοκιμασίας, λεπτομερής περιγραφή της αγωγής, επίπεδα δόσεων, διαλύτες, πρόγραμμα ζευγαρώματος,

— αριθμός και φύλο των απογόνων ανά θηλυκό ζώο, αριθμός και φύλο των απογόνων που αναπτύχθηκαν για ανάλυση μετατόπισης,

— χρόνος και κριτήρια ανάλυσης μετατόπισης,

— αριθμός και λεπτομερής περιγραφή των φορέων μετατόπισης, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων διατροφής και δεδομένων περιεχομένου μήτρας, εάν είναι δυνατόν,

— κυτταρογενετικές διαδικασίες και λεπτομέρειες μικροσκοπικής ανάλυσης, κατά προτίμηση με εικόνες,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος B.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος B.

ΜΕΡΟΣ Γ: ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΜΕΡΟΣ Γ

Οι μέθοδοι δοκιμασίας που περιγράφονται παρακάτω αφορούν τον προσδιορισμό ορισμένων από τις οικοτοξικολογικές ιδιότητες που περιλαμβάνονται στο παράρτημα VIII της οδηγίας 79/831/ΕΟΚ. Τα πρόσωπα που κοινοποιούν μια ουσία στην αρμόδια αρχή πρέπει να γνωρίζουν ότι στο κείμενο δεν περιλαμβάνονται μέθοδοι προσδιορισμού των ακόλουθων ιδιοτήτων, που προβλέπει το επίπεδο 1 του παραρτήματος VIII:

— μελέτη παρατεταμένης τοξικότητας με Daphnia magna,

— δοκιμασία επί ανωτέρου φυτού,

— μελέτη παρατεταμένης τοξικότητας με ιχθύες,

— δοκιμασίες για συσσώρευση σε ένα είδος.

Όταν διαμορφωθούν οριστικά οι κατάλληλες για τον προσδιορισμό των εν λόγω ιδιοτήτων μέθοδοι δοκιμασίας, θα δημοσιευθούν υπό τη μορφή περαιτέρω προσαρμογής στην τεχνική πρόοδο. Εν τω μεταξύ οι κοινοποιούντες πρέπει να χρησιμοποιούν κατάλληλες, μεθόδους διεθνώς αναγνωρισμένες, τις οποίες οφείλουν να δηλώνουν στην αρμόδια αρχή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΑΛΓΩΝ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Σκοπός της δοκιμασίας αυτής είναι να προσδιοριστεί η επίδραση μιας ουσίας στην ανάπτυξη ενός είδους μονοκυττάρων πρασίνων αλγών. Με σχετικά σύντομες δοκιμασίες είναι δυνατό να εκτιμηθούν οι επιδράσεις σε πολλές γενεές. Οι κατευθυντήριες αυτές γραμμές μπορούν να προσαρμοστούν για εφαρμογή σε πολλά είδη μονοκυττάρων αλγών, οπότε, στην έκθεση της δοκιμασίας, πρέπει να περιλαμβάνεται περιγραφή της μεθόδου που χρησιμοποίηθηκε.

Οι κατευθυντήριες αυτές γραμμές εφαρμόζονται πολύ εύκολα για υδατοδιαλυτές ουσίες που, στις συνθήκες της δοκιμασίας, αναμένεται να παραμείνουν στο νερό.

Για ουσίες με περιορισμένη διαλυτότητα στο υλικό ελέγχου μπορεί να μην είναι δυνατό να προσδιοριστεί ποσοτικά ή EC_{50} (βλέπε ορισμό παρακάτω).

Οι κατευθυντήριες γραμμές μπορούν να εφαρμοστούν για ουσίες που δεν παρεμβαίνουν άμεσα στη μέτρηση της ανάπτυξης των αλγών.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας αυτής μπορούν να χρησιμεύσουν οι ακόλουθες πληροφορίες:

— διαλυτότητα στο νερό,

— τάση ατμών,

— συντακτικός τύπος,

— καθαρότητα της ουσίας,

— χημική σταθερότητα στο νερό και το φως,

— αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στο νερό,

— τιμή της pKa,

— συντελεστής κατανομής σε μείγμα n-οκτανόλης/νερού,

— αποτελέσματα από μια απλή δοκιμασία βιοαποικοδόμησης (βλέπε κατευθυντήριες γραμμές δοκιμασίας 301 A-E).

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Κυτταρική συγκέντρωση: αριθμός κυττάρων ανά ml.

Ανάπτυξη: αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης κατά την περίοδο δοκιμασίας. Ταχύτητα ανάπτυξης: αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης στη μονάδα χρόνου.

EC_{50}: στις κατευθυντήριες αυτές γραμμές, εκείνη η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας που προκαλεί μείωση κατά 50% είτε στην ανάπτυξη ή στην ταχύτητα ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα.

NOEC (no observed effect concentration — συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση): στις κατευθυντήριες αυτές γραμμές, η υψηλότερη συγκέντρωση ελέγχου στην οποία η (οι) πειραματική(ές) παράμετρος(οι) δεν δείχνει(ουν) σημαντική αναστολή της ανάπτυξης σε σχέση με τις τιμές για τους μάρτυρες.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ουσία αναφοράς για να προσδιοριστούν οι μη ικανοποιητικές συνθήκες δοκιμασίας. Όταν χρησιμοποιείται ουσία αναφοράς, τα αποτελέσματα περιγράφονται στην έκθεση της δοκιμασίας. Ως ουσία αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί το διχρωμικό κάλιο.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Λογαριθμικές καλλιέργειες επιλεγμένων πρασίνων αλγών εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας επί πολλές γενεές σε καθορισμένες συνθήκες. Προσδιορίζεται η αναστολή της ανάπτυξης σε ορισμένη περίοδο σε σχέση με μια καλλιέργεια-μάρτυρα.

1.5. **Ποιοτικά κριτήρια**

1.5.1. *Όροι για την εγκυρότητα της δοκιμασίας*

Η κυτταρική συγκέντρωση των καλλιεργειών-μαρτύρων θα πρέπει να αυξάνεται με συντελεστή τουλάχιστον 16 μέσα σε τρεις ημέρες.

Η εξαφάνιση της ελεγχόμενης ουσίας από το νερό μέσα στη βιομάζα δεν ακυρώνει απαραίτητα τη δοκιμασία.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

1.6.1. *Προετοιμασία*

1.6.1.1. Εξοπλισμός και υλικά

— Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός.

— Δοκιμαστικές φιάλες με κατάλληλο όγκο (π.χ. κωνικές φιάλες των 250 ml είναι κατάλληλες για 100 ml δοκιμαστικού διαλύματος).

— Συσκευή καλλιέργειας: ερμάριο ή θάλαμος όπου η θερμοκρασία μπορεί να διατηρείται στην περιοχή 21 — 25 ± 2 °C και υπάρχει συνεχής ομοιόμορφος φωτισμός στη φασματική περιοχή 400 — 700 nm. [Συνιστάται κβαντική ροή $0,72 \times 10^{20}$ φωτόνια/m^2s με ακρίβεια ± 20%.

Η κβαντική αυτή ροή ισούται με 120 μE/m^2s και μπορεί να επιτευχθεί με λαμπτήρες φθορισμού γενικής χρήσης, λευκού τύπου (θερμοκρασία φωτός 4 200 K κατά προσέγγιση) που αποδίδουν 8 000 lux περίπου μετρημένες με σφαιρικό συλλέκτη.]

— Συσκευή για τον προσδιορισμό των κυτταρικών συγκεντρώσεών, π.χ. ηλεκτρονικός μετρητής σωματιδίων, μικροσκόπιο με θάλαμο μετρήσεων, φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο, χρωματόμετρο (*Σημείωση:* για να ληφθούν σωστές μετρήσεις σε χαμηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις όταν χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο, μπορεί να απαιτηθούν κυψελίδες με οπτική διαδρομή 4 cm τουλάχιστον).

1.6.1.2. Υλικό αλγών

Συνιστάται το εξής υλικό:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3:	0,185	mg/l,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

Το pH του υλικού αυτού, μετά την αποκατάσταση ισορροπίας με τον αέρα, είναι περίπου 8.

Η παραπάνω σύσταση δεν αποκλείει τη χρήση άλλων υλικών, με την προϋπόθεση όμως να τηρούνται τα ακόλουθα όρια ως προς τα κύρια συστατικά:

P:	⩽ 0,7 mg/l,
N:	⩽ 10 mg/l,
χηλικά μέσα:	⩽ 10^{-3} mmol/l,
σκληρότητα (Ca + Mg):	⩽ 0,6 mmol/l.

Το υλικό που συνιστάται και αυτό που αναφέρεται στην παραπομπή (1) ανταποκρίνονται στην απαίτηση αυτή.

1.6.1.3. Πειραματικοί οργανισμοί

Επιλογή είδους

Προτείνεται η χρησιμοποίηση ειδών πρασίνων αλγών που αναπτύσσονται με ταχύτητα και προσφέρονται για καλλιέργεια και δοκιμασία. Κατάλληλα θεωρούνται τα εξής είδη:

— Selenastrum capricornutum ATCC 22662,

— Scenedesmus subspicatus 86.81 SAG,

— Chlorella vulgaris CCAP 211/11b.

Αν χρησιμοποιούνται άλλα είδη, πρέπει να αναφέρεται το στέλεχος.

1.6.1.4. Σχεδιασμός της δοκιμασίας

Αρχική κυτταρική συγκέντρωση

Συνιστάται η αρχική κυτταρική συγκέντρωση των ελεγχομένων καλλιεργειών να είναι κατά προσέγγιση 10^4 κύτταρα/ml για τα είδη Sclenastrum capricornutum και Scenedesmus subspicatus. Όταν χρησιμοποιούνται άλλα είδη, η βιομάζα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμη.

Συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας

Η σειρά των συγκεντρώσεων που μπορεί να έχουν επίδραση προσδιορίζεται με βάση τα αποτελέσματα από δοκιμασίες προσδιορισμού σειράς. Για τη δοκιμασία επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Στη χαμηλότερη ελεγχόμενη συγκέντρωση δεν θα πρέπει να παρατηρείται επίδραση στην ανάπτυξη των αλγών. Η υψηλότερη ελεγχόμενη συγκέντρωση θα πρέπει να αναστέλλει την ανάπτυξη κατά 50% τουλάχιστον, σε σχέση με το μάρτυρα, και κατά προτίμηση να σταματά εντελώς την ανάπτυξη.

Επαναλήψεις και μάρτυρες

Ο σχεδιασμός της δοκιμασίας θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις κατά προτίμηση επαναλήψεις σε κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση και, στην ιδανική περίπτωση, διπλάσιο από αυτόν αριθμό μαρτύρων. Με την ανάλογη αιτιολόγηση, ο σχεδιασμός της δοκιμασίας μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των επαναλήψεων ανά συγκέντρωση.

Όταν χρησιμοποιείται φορέας διαλυτοποίησης της ελεγχόμενης ουσίας, ο σχεδιασμός της δοκιμασίας θα πρέπει να περιλαμβάνει πρόσθετους μάρτυρες που να περιέχουν το φορέα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στις ελεγχόμενες καλλιέργειες.

1.6.2. *Εκτέλεση της δοκιμασίας*

Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει οδηγίες για τον έλεγχο ευδιαλύτων και δυσδιαλύτων ουσιών καθώς και πτητικών ουσιών.

1.6.2.1. Έλεγχος ουσιών ευδιαλύτων στο νερό

Παρασκευάζονται καλλιέργειες δοκιμασίας που περιέχουν τις επιθυμητές συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας και την επιθυμητή ποσότητα ενοφθαλμίσματος από άλγη, με αραίωση κλασμάτων από μητρικά διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας και εναιωρήματος αλγών με διηθημένο υλικό αλγών.

Οι φιάλες με τις καλλιέργειες ανακινούνται και τοποθετούνται στη συσκευή καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας είναι αναγκαίο να διατηρούνται τα άλγη σε αιώρηση και να διευκολύνεται η μεταφορά CO_2. Για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανάδευση ή αερισμός. Οι καλλιέργειες πρέπει να διατηρούνται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία 21 — 25 ± 2 °C.

Η κυτταρική συγκέντρωση σε κάθε φιάλη προσδιορίζεται τουλάχιστον στις 24, 48 και 72 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας. Χρησιμοποιείται διηθημένο υλικό αλγών για τον προσδιορισμό των τυχαίων ενδείξεων στους μετρητές σωματιδίων ή ως τυφλό για το φασματοφωτόμετρο.

Το pH μετριέται στην αρχή της δοκιμασίας και στις 72 ώρες. Το pH των διαλυμάτων δεν θα πρέπει κανονικά να μεταβάλλεται περισσότερο από μία μονάδα στη διάρκεια της δοκιμασίας.

1.6.2.2. Έλεγχος ουσιών με περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό

Όταν η διαλυτότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας είναι της τάξης της υψηλότερης συγκέντρωσης που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία, απαιτούνται μικρές μόνο παρεκκλίσεις από την παραπάνω διαδικασία για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμασίας. Ως μητρικό διάλυμα της δοκιμαζόμενης ουσίας μπορεί να χρησιμεύσει ένα κεκορεσμένο διάλυμα. Ένας άλλος τρόπος εργασίας είναι να διαλυθεί η δοκιμαζόμενη ουσία στο υλικό αλγών στην επιθυμητή συγκέντρωση πριν από την προσθήκη του εναιωρήματος αλγών.

Τα μητρικά διαλύματα ουσιών με μικρή διαλυτότητα στο νερό μπορούν να παρασκευαστούν με μηχανική διασπρά ή με τη βοήθεια φορέων χαμηλής τοξικότητας για τα άλγη, όπως οργανικοί διαλύτες, γαλακτωματοποιητές ή μέσα διασποράς. Όταν χρησιμοποιούνται φορείς, η συγκέντρωση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 100 mg/l, ενώ ο σχεδιασμός της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει πρόσθετους μάρτυρες που να περιέχουν το φορέα στην υψηλότερη συγκέντρωση που εμφανίζεται στα διαλύματα της δοκιμασίας.

1.6.2.3. Έλεγχος πτητικών ουσιών

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει γενικά παραδεκτός τρόπος για τον έλεγχο πτητικών ουσιών. Όταν είναι γνωστό ότι μια ουσία έχει την τάση να εξατμίζεται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλειστές δοκιμαστικές φιάλες με αυξημένο χώρο στην κορυφή. Έχουν προταθεί παραλλαγές της μεθόδου αυτής [βλέπε παραπομπή (1)].

Θα πρέπει να επιχειρείται ο προσδιορισμός της ποσότητας της ουσίας που παραμένει στα διαλύματα και συνιστάται εξαιρετική προσοχή κατά την ερμηνεία αποτελεσμάτων από δοκιμασίες με πτητικές χημικές ουσίες σε κλειστά συστήματα.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Οι κυτταρικές συγκεντρώσεις που μετριούνται στις δοκιμαζόμενες καλλιέργειες και στους μάρτυρες παρουσιάζονται σε πίνακα μαζί με τις συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας και τους χρόνους των μετρήσεων. Η μέση τιμή της κυτταρικής συγκέντρωσης για κάθε συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας και για τους μάρτυρες παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με το χρόνο ώστε να ληφθούν καμπύλες ανάπτυξης. Για τον προσδιορισμό της σχέσης συγκέντρωσης/επίδρασης χρησιμοποιούνται οι εξής δύο τρόποι:

2.1. **Σύγκριση των εμβαδών που περικλείουν οι καμπύλες ανάπτυξης**

Το εμβαδόν που περικλείουν οι καμπύλες ανάπτυξης μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με τον τύπο:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

όπου:

A = εμβαδόν,
N_0 = ονομαστική τιμή κυττάρων/ml σε χρόνο t_0,
N_1 = πειραματική τιμή κυττάρων/ml σε χρόνο t_1,
N_n = πειραματική τιμή κυττάρων/ml σε χρόνο t_n,
t_1 = χρόνος της πρώτης μέτρησης από την έναρξη της δοκιμασίας,
t_n = χρόνος της νιοστής μέτρησης από την έναρξη της δοκιμασίας.

Το επί τοις εκατό ποσοστό της κυτταρικής ανάπτυξης σε κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (I_A) υπολογίζεται ως η διαφορά ανάμεσα στο εμβαδόν που πρικλείεται από την καμπύλη ανάπτυξης του μάρτυρα (A_c) και στο εμβαδόν που πρικλείεται από την καμπύλη ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας (A_t)

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Οι τιμές I_A παριστάνονται γραφικά σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε ημιλογαριθμικό χαρτί ή σε ημιλογαριθμικό χαρτί με μονάδες πιθανότητας. Αν τα σημεία έχουν παρασταθεί σε χαρτί με μονάδες πιθανότητας, συνδέονται με ευθεία γραμμή, ενώ, όταν προβλέπεται εκθετική κατανομή των τιμών, μπορεί να χαραχθεί η καμπύλη γραμμή με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Η τιμή EC_{50} προκύπτει από το σημείο τομής της καμπύλης με την παράλληλο προς την τετμημένη που φέρεται στο σημείο I_A = 50%. Για το σαφή συμβολισμό της τιμής αυτής, σε συσχέτιση με αυτή τη μέθοδο υπολογισμού, προτείνεται η χρήση του συμβόλου E_bC_{50}. Σε σχέση με την κατευθυντήρια αυτή γραμμή, που καθορίζει μετρήσεις στις 24, 48 και 72 ώρες, το σύμβολο γίνεται E_bC_{50} (0 – 72 h).

Από τη γραφική παράσταση της I_A σε συνάρτηση με το λογάριθμο των συγκεντρώσεων λαμβάνονται και άλλες τιμές EC, όπως η E_bC_{10}.

2.2. **Σύγκριση των ταχυτήτων ανάπτυξης**

Η μέση ειδική ταχύτητα ανάπτυξης (μ) για λογαριθμικές καλλιέργειες μπορεί να υπολογισθεί ως:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Εναλλακτικά, η μέση ειδική ταχύτητα ανάπτυξης μπορεί να προκύψει από την κλίση της καμπύλης της γραφικής παράστασης του PnN σε συνάρτηση με το χρόνο.

Το επί τοις εκατό ποσοστό μείωσης της μέσης ταχύτητας ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, σε σύγκριση με το μάρτυρα, παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με το λογάριθμο των συγκεντρώσεων. Η τιμή EC_{50} προκύπτει από το λαμβανόμενο διάγραμμα. Για το σαφή συμβολισμό της EC_{50} που λαμβάνεται με τη μέθοδο αυτή προτείνεται η χρήση του συμβόλου E_rC_{50}. Οι χρόνοι μετρήσεων πρέπει να αναφέρονται, π.χ. αν η τιμή σχετίζεται με παρατήρηση στις 24 και 48 ώρες, το σύμβολο γίνεται E_rC_{50} (24-48 h).

Σημείωση: Η ταχύτητα ανάπτυξης είναι λογαριθμικός όρος και μικρές αλλαγές στην ταχύτητα ανάπτυξης μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλες αλλαγές της βιομάζας. Κατά συνέπεια οι E_bC και E_rC δεν είναι συγκρίσιμες αριθμητικά.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Η έκθεση της δοκιμασίας περιλαμβάνει, αν είναι δυνατόν, τις εξής πληροφορίες:

— Ελεγχόμενη ουσία: δεδομένα χημικού προσδιορισμού.

— Οργανισμοί ελέγχου: προέλευση, εργαστηριακή καλλιέργεια, αριθμός στελέχους, μέθοδος καλλιέργειας.

— Συνθήκες της δοκιμασίας:

  — ημερομηνία αρχής και τέλους της δοκιμασίας και η διάρκειά της,
  — θερμοκρασία,

- σύνθεση του υλικού,
- συσκευή καλλιέργειας,
- το pH των διαλυμάτων στην αρχή και το τέλος της δοκιμασίας (πρέπει να δίνονται εξηγήσεις αν έχουν παρατηρηθεί αποκλίσεις στην τιμή του pH μεγαλύτερες από μία μονάδα),
- φορέας και μέθοδος που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλυτοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας καθώς και συγκέντρωση του φορέα στα διαλύματα ελέγχου,
- ένταση και ποιότητα του φωτός,
- συγκεντρώσεις ελέγχου (πειραματικές ή ονομαστικές);

— Αποτελέσματα:

- κυτταρική συγκέντρωση σε κάθε φιάλη για κάθε χρόνο μέτρησης και μέθοδος για τη μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης,
- μέσος όρος των κυτταρικών συγκεντρώσεων,
- καμπύλες ανάπτυξης,
- γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης,
- τιμές EC και μέθοδος υπολογισμού,
- NOEC,
- άλλες επιδράσεις που παρατηρήθηκαν.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 201*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus", in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Προσάρτημα

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΛΓΩΝ

Γενικές παρατηρήσεις

Σκοπός της καλλιέργειας με βάση την παρακάτω διαδικασία είναι η λήψη καλλιεργειών αλγών για δοκιμασίες τοξικότητας.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι που να εξασφαλίζουν ότι οι καλλιέργειες αλγών δεν θα μολύνονται με βακτηρίδια (πρότυπο ISO 4833). Αν οι στείρες καλλιέργειες κρίνονται επιθυμητές, οι καλλιέργειες ενός μόνο είδους αλγών είναι αναγκαίες.

Όλοι οι χειρισμοί μπορούν να διεξάγονται υπό συνθήκες αποστείρωσης ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση με βακτηρίδια και άλλα άλγη.

Εξοπλισμός και υλικά

Βλέπε 1.6.1: Προετοιμασία — Πειραματικοί οργανισμοί.

Διαδικασία για τη λήψη καλλιεργειών αλγών

Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων (μέσων)

Όλα τα θρεπτικά άλατα του μέσου παρασκευάζονται σαν πυκνά μητρικά διαλύματα και φυλάσσονται σε σκοτεινό και ψυχρό χώρο. Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται με διήθηση ή σε αυτόκαυστο.

Το μέσον παρασκευάζεται με προσθήκη της σωστής ποσότητας μητρικού διαλύματος σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, με τρόπο που να αποκλείει τις μολύνσεις. Προκειμένου να παρασκευαστεί στερεό υλικό, προστίθεται 0,8 % αγάρ αγάρ.

Μητρική καλλιέργεια

Οι μητρικές καλλιέργειες είναι μικρές καλλιέργειες αλγών που μεταφέρονται τακτικά σε πρόσφατο υλικό ώστε να χρησιμεύσουν σαν αρχικό υλικό ελέγχου. Αν οι καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται τακτικά, εμβολιάζονται σε κεκλιμένους σωλήνες με αγάρ αγάρ. Αυτές οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε πρόσφατο υλικό τουλάχιστον κάθε δύο μήνες.

Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν το κατάλληλο υλικό (όγκος 100 ml περίπου). Όταν τα άλγη επωάζονται στους 20 °C υπό συνεχή φωτισμό, απαιτείται εβδομαδιαία μεταφορά.

Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, ένα μέρος της «παλιάς» καλλιέργειας φέρεται με αποστειρωμένα σιφώνια σε φιάλη με πρόσφατο υλικό, έτσι ώστε, για τα είδη ταχείας ανάπτυξης, η αρχική συγκέντρωση να είναι 100 φορές περίπου μικρότερη από της παλιάς καλλιέργειας.

Η ταχύτητα ανάπτυξης ενός είδους μπορεί να προσδιοριστεί από την καμπύλη ανάπτυξης. Αν αυτή είναι γνωστή, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η πυκνότητα που θα πρέπει να έχει η καλλιέργεια όταν μεταφέρεται σε νέο υλικό. Ο υπολογισμός αυτός πρέπει να γίνεται πριν φτάσει η καλλιέργεια στη φάση θανάτου.

Προκαταρκτική καλλιέργεια

Η προκαταρκτική καλλιέργεια προορίζεται να δώσει την κατάλληλη ποσότητα αλγών για τον ενοφθαλμισμό των ελεγχομένων καλλιεργειών. Η προκαταρκτική καλλιέργεια επωάζεται στις συνθήκες της δοκιμασίας και χρησιμοποιείται όταν ακόμα βρίσκεται στη φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης, κανονικά μετά από περίοδο επώασης τριών ημερών περίπου. Όταν οι καλλιέργειες αλγών περιέχουν παραμορφωμένα ή ανώμαλα κύτταρα πρέπει να απορρίπτονται.

ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΕΧΝΗΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Στην εργαστηριακή αυτή δοκιμασία, η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται σε τεχνητό έδαφος στο οποίο τοποθετούνται γαιοσκώληκες για 14 ημέρες. Μετά την περίοδο αυτή (και προαιρετικά μετά από επτά ημέρες) εξετάζεται η θανατηφόρος δράση της ουσίας στους γαιοσκώληκες. Η δοκιμασία παρέχει μέθοδο για τη σχετική βραχυπρόθεσμη παρακολούθηση της δράσης χημικών ουσιών στους γαιοσκώληκες, με πρόσληψη από το δέρμα ή την τροφική οδό.

1.2. Ορισμός και μονάδα

LC_{50}: Η συγκέντρωση μιας ουσίας που υπολογίζεται ότι σκοτώνει το 50 % των πειραματοζώων κατά την περίοδο της δοκιμασίας.

1.3. Ουσία αναφοράς

Χρησιμοποιείται περιοδικά μια ουσία αναφοράς για να επιβεβαιώνεται ότι η ευαισθησία του συστήματος ελέγχου δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά.

Ως ουσία αναφοράς συνιστάται το χλωροακεταμίδιο αναλυτικής καθαρότητας.

1.4. Αρχή της δοκιμασίας

Το έδαφος είναι μεταβλητό μέσο, ώστε στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται τεχνητό αργιλώδες έδαφος που έχει καθοριστεί με προσοχή. Ενήλικες γαιοσκώληκες του είδους Eisenia foetida (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) διατηρούνται σε καθορισμένο τεχνητό έδαφος που έχει υποστεί κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Το περιεχόμενο των δοχείων απλώνεται σε δίσκο 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας και μετριούνται οι γαιοσκώληκες που έχουν επιζήσει σε κάθε συγκέντρωση.

1.5. Ποιοτικά κριτήρια

Η δοκιμασία έχει μελετηθεί για να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή αναπαραγωγιμότητα σε σχέση με το υπόστρωμα και τον οργανισμό ελέγχου. Η θνησιμότητα των μαρτύρων στο τέλος της δοκιμασίας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %, διαφορετικά η δοκιμασία είναι άκυρη.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

1.6.1. *Υλικά*

1.6.1.1. Υπόστρωμα δοκιμασίας

Ως βασικό υπόστρωμα για τη δοκιμασία χρησιμοποιείται καθορισμένο τεχνητό έδαφος.

α) Βασικό υπόστρωμα (τα ποσοστά εκφράζουν ξηρό βάρος)

- 10 % τύρφη σφάγνων (με pH όσο το δυνατό πλησιέστερα στο 5,5 – 6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτού και λεπτά αλεσμένη),
- 20 % άργιλος καολινίτη, κατά προτίμηση με περισσότερο από 50 % καολινίτη,
- 69 % περίπου βιομηχανική χαλαζιακή άμμος (να υπερισχύει η λεπτή άμμος με ποσοστό περισσότερο από 50 % σε μέγεθος σωματιδίων 0,05 έως 0,2 mm). Αν η ουσία δεν διασπείρεται αρκετά στο νερό, φυλάσσονται 10 g ανά δοχείο δοκιμασίας για να αναμειχθούν αργότερα με τη δοκιμαζόμενη ουσία.
- 1 % περίπου ανθρακικό ασβέστιο ($CaCO_3$), κονιοποιημένο, χημικά καθαρό, που προστίθεται για να ρυθμιστεί το pH στο 6,0 ± 0,5.

β) Υπόστρωμα δοκιμασίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας περιέχει το βασικό υπόστρωμα, την ελεγχόμενη ουσία και απιονισμένο νερό.

Η περιεκτικότητα σε νερό είναι περίπου 25 έως 42 % του ξηρού βάρους του βασικού υποστρώματος και προσδιορίζεται με ξήρανση ενός δείγματος στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Το κριτήριο-κλειδί είναι ότι το τεχνητό έδαφος πρέπει να υγρανθεί τόσο ώστε να μην υπάρχει στάσιμο νερό. Η ανάμειξη γίνεται με προσοχή για να ληφθεί ομοιόμορφη κατανομή της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα. Ο τρόπος ενσωμάτωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα πρέπει να αναφέρεται.

γ) Υπόστρωμα-μάρτυρας

Το υπόστρωμα-μάρτυρας περιέχει το βασικό υπόστρωμα και νερό. Αν χρησιμοποιούνται πρόσθετα, παρασκευάζεται συμπληρωματικός μάρτυρας που περιέχει την ίδια ποσότητα προσθέτου.

1.6.1.2. Δοχεία δοκιμασίας

Είναι γυάλινα δοχεία χωρητικότητας ενός λίτρου περίπου (κατάλληλα σκεπασμένα με πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή με πλαστική μεμβράνη με οπές αερισμού), γεμάτα με μια ποσότητα υγρού υποστρώματος ελέγχου ή μάρτυρα που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους υποστρώματος.

1.6.2. *Συνθήκες δοκιμασίας*

Τα δοχεία διατηρούνται σε κλιματιζόμενους θαλάμους σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C με συνεχές φως. Η ένταση του φωτός θα πρέπει να είναι 400 έως 800 lux.

Η περίοδος δοκιμασίας είναι 14 ημέρες αλλά η θνησιμότητα μπορεί να υπολογιστεί προαιρετικά επτά ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας.

1.6.3. *Διαδικασία δοκιμασίας*

Συγκεντρώσεις δοκιμασίας

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας εκφράζονται ως βάρος της ουσίας ανά ξηρό βάρος του βασικού υποστρώματος (mg/kg).

Δοκιμασία προσδιορισμού σειράς

Η σειρά των συγκεντρώσεων που προξενούν θνησιμότητα από 0 μέχρι 100% μπορεί να βρεθεί με δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ώστε να συγκεντρωθούν πληροφορίες για τη σειρά συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμασία.

Οι ουσίες ελέγχονται στις εξής συγκεντρώσεις: 1 000, 100, 10, 1 και 0,1 mg ουσίας/kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Αν πρόκειται να διεξαχθεί πλήρης οριστική δοκιμασία, ένας κύκλος δοκιμασίας ανά συγκέντρωση και ένας για τον μάρτυρα που δεν έχει υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκώληκες, επαρκούν για τη δοκιμασία προσδιορισμού σειράς.

Οριστική δοκιμασία

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας προσδιορισμού σειράς χρησιμοποιούνται για την εκλογή πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεων σε γεωμετρική σειρά που να καλύπτουν ακριβώς την κλίμακα θνησιμότητας 0 έως 100% και να διαφέρουν κατά σταθερό συντελεστή όχι μεγαλύτερο από 1,8.

Η δοκιμασία που εκτελείται με αυτές τις σειρές συγκεντρώσεων επιτρέπει να προσδιοριστούν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης γι' αυτήν.

Στην οριστική δοκιμασία διεξάγονται τέσσερις τουλάχιστον κύκλοι ελέγχου ανά συγκέντρωση και τέσσερις για τους μάρτυρες που δεν έχουν υποστεί κατεργασία, καθένας με δέκα σκώληκες. Το αποτέλεσμα αυτών των σειρών δοκιμών εκφράζονται ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προκαλούν θνησιμότητα μόνο 0% και 100%, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50}.

Ανάμειξη του βασικού υποστρώματος δοκιμασίας και της δοκιμαζόμενης ουσίας

Το υπόστρωμα δοκιμασίας θα πρέπει, κατά το δυνατό, να παρασκευάζεται χωρίς άλλα πρόσθετα μέσα εκτός από νερό. Αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, ένα γαλάκτωμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε απιονισμένο νερό ή άλλο διαλύτη αναμειγνύεται με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας ή ψεκάζεται ομοιόμορφα πάνω από αυτό με λεπτό χρωματογραφικό ή παρόμοιο ψεκαστήρα.

Αν η ελεγχόμενη ουσία δεν διαλύεται στο νερό, είναι δυνατόν να διαλυθεί σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο).

Μόνο μέσα που εξαερώνονται εύκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση, διασπορά ή γαλακτωματοποίηση της ελεγχόμενης ουσίας. Το υπόστρωμα ελέγχου πρέπει να αερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί. Η ποσότητα νερού που εξατμίζεται πρέπει να αναπληρώνεται. Ο μάρτυρας περιέχει την ίδια ποσότητα από οποιαδήποτε πρόσθετο.

Αν η δοκιμαζόμενη ουσία δεν διαλύεται, διασπείρεται ή γαλακτωματοποιείται σε οργανικούς διαλύτες, 10 g ενός μείγματος από λεπτή κονιοποιημένη χαλαζιακή άμμο και την ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που απαιτείται για την κατεργασία 500 g ξηρού βάρους τεχνητού εδάφους, αναμειγνύονται με 490 g ξηρού βάρους υποστρώματος δοκιμασίας.

Για κάθε κύκλο δοκιμασίας, ποσότητα υγρού υποστρώματος δοκιμασίας που ισοδυναμεί με 500 g ξηρού βάρους τοποθετείται σε κάθε γυάλινο δοχείο. Δέκα γαιοσκώληκες, που έχουν προκαλλιεργηθεί για 24 ώρες σε παρόμοιο υγρό βασικό υπόστρωμα, στη συνέχεια έχουν πλυθεί και η περίσσεια του νερού έχει απορροφηθεί με διηθητικό χαρτί πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετούνται στην επιφάνεια του υποστρώματος δοκιμασίας.

Τα δοχεία καλύπτονται με διάτρητα πλαστικά καλύμματα, πλάκες ή μεμβράνη για να μην ξηρανθεί το υπόστρωμα και διατηρούνται στις συνθήκες της δοκιμασίας για 14 ημέρες.

Οι εκτιμήσεις γίνονται 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμασίας. Το υπόστρωμα απλώνεται σε δίσκο κατασκευασμένο από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα. Εξετάζονται οι γαιοσκώληκες και προσδιορίζεται ο αριθμός αυτών που επιζούν. Οι γαιοσκώληκες θεωρούνται νεκροί αν δεν αντιδρούν σε ελαφρό μηχανικό ερεθισμό στο πρόσθιο άκρο τους.

Όταν η εξέταση γίνεται μετά από επτά ημέρες, το δοχείο γεμίζεται πάλι με το υπόστρωμα και οι επιζώντες γαιοσκώληκες επανατοποθετούνται στην επιφάνεια του ίδιου υποστρώματος ελέγχου.

1.6.4. *Οργανισμοί δοκιμασίας*

Οι οργανισμοί δοκιμασίας θα πρέπει να είναι ενήλικες Eisenia foetida (βλέπε σημείωση στο προσάρτημα) (ηλικίας τουλάχιστον δύο μηνών, με δακτυλιοειδή τμήματα) υγρού βάρους 300 έως 600 mg. (Για μέθοδο εκτροφής βλέπε προσάρτημα.)

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. Επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας αναφέρονται σε συσχετισμό με τα αντίστοιχα ποσοστά νεκρών γαιοσκωλήκων.

Όταν τα δεδομένα είναι αρκετά, η τιμή LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης ($p = 0,05$) προσδιορίζονται με πρότυπες μεθόδους (Litchfield και Wilcoxon, 1949, ή αντίστοιχη μέθοδο). Η τιμή LC_{50} δίνεται ως mg της ελεγχόμενης ουσίας ανά kg υποστρώματος ελέγχου (ξηρό βάρος).

Σε περίπτωση που η κλίση της καμπύλης συγκεντρώσεων είναι πολύ μεγάλη και δεν επιτρέπει τον υπολογισμό της LC_{50}, αρκεί ο γραφικός υπολογισμός της τιμής αυτής.

Όταν δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 1,8 προσκαλούν θνησιμότητα μόνο 0% και 100%, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές για να δειχθεί η περιοχή τιμών μέσα στην οποία βρίσκεται η τιμή της LC_{50}.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας περιλαμβάνει, αν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

— δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω ποιοτικά κριτήρια,

— τη δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε (δοκιμασία προσδιορισμού σειράς ή/και οριστική δοκιμασία),

— ακριβή περιγραφή των συνθηκών της δοκιμασίας ή δήλωση ότι η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο· οποιεσδήποτε παρεκκλίσεις πρέπει να αναφέρονται,

— ακριβή περιγραφή του τρόπου με τον οποίο η δοκιμαζόμενη ουσία αναμείχθηκε με το βασικό υπόστρωμα δοκιμασίας,

— πληροφορίες για τους οργανισμούς δοκιμασίας (είδος, ηλικία, μέσος όρος και κλίμακα βάρους, συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής, προμηθευτής),

— τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της LC_{50},

— τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένων όλων των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν,

— περιγραφή συμπτωμάτων ή αλλαγών συμπεριφοράς που παρατηρήθηκαν στους οργανισμούς των μαρτύρων,

— τη θνησιμότητα των μαρτύρων,

— την τιμή LC_{50} ή την υψηλότερη συγκέντρωση ελέγχου που δεν προκάλεσε θνησιμότητα και τη χαμηλότερη συγκέντρωση που προκάλεσε θνησιμότητα 100%, 14 ημέρες (και προαιρετικά επτά ημέρες) μετά την έναρξη της δοκιμάσιας,

— γραφική παράσταση της καμπύλης συγκέντρωσης/απόκρισης,

— τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με την ουσία αναφοράς, είτε στα πλαίσια της δοκιμασίας αυτής είτε από προηγούμενα πειράματα ποιοτικού ελέγχου.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 207*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*. Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut national de la recherche agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. of Pharm. and Exp. Therap., 1, vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, έκθεση EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Προσάρτημα

Αναπαραγωγή και διατήρηση των σκωλήκων πριν από τη δοκιμασία

Για την αναπαραγωγή οργανισμών, 30 έως 50 ενήλικες σκώληκες τοποθετούνται σε δοχείο αναπαραγωγής με φρέσκο υπόστρωμα και μεταφέρονται μετά από 14 ημέρες. Οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για νέους κύκλους αναπαραγωγής. Οι γαιοσκώληκες που εκκολάπτονται από τους βόμβυκες χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία αφού ωριμάσουν (στις συνθήκες που καθορίζονται, μετά από δύο έως τρεις μήνες).

Συνθήκες διατήρησης και αναπαραγωγής

Κλιματιζόμενος θάλαμος: θερμοκρασία 20 ± 2 °C, κατά προτίμηση με συνεχές φως (ένταση 400 έως 800 lux).

Δοχεία αναπαραγωγής: κατάλληλα ρηχά δοχεία με όγκο 10 έως 20 l.

Υπόστρωμα: Οι οργανισμοί Eisenia foetida μπορούν να αναπαραχθούν σε διάφορα ζωικά περιττώματα. Συνιστάται η χρήση ενός μείγματος από 50% κατ' όγκο τύρφη και 50% κοπριά αγελάδας ή αλόγου σαν υλικού αναπαραγωγής. Το υλικό θα πρέπει να έχει pH 6 έως 7 περίπου (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο) και χαμηλή ιονική αγωγιμότητα (λιγότερο από 6 mm hos ή 0,5% συγκέντρωση αλάτων)

Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι πολύ βρεγμένο.

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλες επιτυχείς μέθοδοι.

Σημείωση: Οι γαιοσκώληκες Eisenia foetida απαντούν σε δύο οικογένειες, τις οποίες ορισμένοι ειδικοί στην ταξινόμηση έχουν διαχωρίσει σε είδη (Bouche, 1972). Οι δύο οικογένειες είναι παρόμοιες μορφολογικά αλλά η μία, Eisenia foetida foetida, παρουσιάζει τυπικές εγκάρσιες ζώνες ή λωρίδες στα μεταμερίδια ενώ η άλλη, Eisenia foetida andrei, δεν τις έχει και είναι ποικιλόχρωμη με κοκκινωπή απόχρωση. Αν είναι δυνατόν, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η Eisenia foetida andrei. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη αν είναι γνωστή η αναγκαία μεθοδολογία.

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ZAHN-WELLENS

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Η μέθοδος αποβλέπει στην εκτίμηση της δυνητική τελικής βιοαποικοδομητικότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν αυτές εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών σε στατιστική δοκιμασία.

Στα εν αιωρήσει στερεά, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυσικοχημική προσρόφηση και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2.).

Οι υπό μελέτη ουσιές χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις που αντιστοιζούν σε τιμές DOC μεταξύ 50 και 400 mg/l ή τιμές COD μεταξύ 100 και 1 000 mg/l (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνθρακας· COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο). Οι σχετικές υψηλες αυτές συγκεντρώσεις παραυσιάζουν το πλεονέκτημα της αναλυτικής αξιοπιστίας. Ενώσεις με τοξικές ιδιότητες μπορούν να επιβραδύνουν ή να αναστείλουν τη διαδικασία αποικοδομήσεως.

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα ή της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδόμησης της ουσίας που υποβάλλεται στη δοκιμασία.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει τον προσδιορισμό της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης της ουσίας (εξαφάνιση της αρχικής χημικής δομής).

Η μέθοδος εφαρμόζεται αποκλειστικά στις υπό δοκιμασία οργανικές ουσίες εφόσον, στη συγκέντρωση υπό την οποία χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία:

— είναι υδατοδιαλυτές στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία,

— η τάση των ατμών τους στις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η δοκιμασία είναι αμελητέα,

— δεν αποτελούν αντιβακτηριακούς παράγοντες,

— η προσρόφησή τους στο σύστημα της δοκιμασίας είναι περιορισμένη,

— δεν χάνονται από το διάλυμα της δοκιμασίας λόγω του σχηματισμού αφρού.

Στοιχεία που αφορούν τη σχετική αναλογία των κυριότερων συστατικών του υπό δοκιμασία υλικού θα είναι χρήσιμα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ιδίως στις περιπτώσεις όπου οι τιμές των αποτελεσμάτων είναι μικρές ή οριακές.

Είναι σκόπιμο να γνωστοποιούνται τα στοιχεία που αφορούν την τοξικότητα της ουσίας σε μικροοργανισμούς προκειμένου να χρησιμοποιούνται στην ερμηνεία των χαμηλών τιμών των αποτελεσμάτων και στην επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για τη δοκιμασία.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Ο βαθμός αποικοδόμησης που λαμβάνεται στο τέλος της δοκιμασίας αναφέρεται ως «Βιοαποικοδομητικότητα στην δοκιμασία Zahn-Wellens»

$$D_T\,(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

όπου:

D_T = βιοαποικοδόμηση (%) σε χρόνο T,

C_A = τιμές DOC (ή COD) στο μείγμα τις δοκιμασίας, η μέτρηση των οποίων έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη της δοκιμασίας (mg/l) (DOC = dissolved organic carbon/διαλελυμένος οργανικός άνδρακας· COD = chemical oxygen demand/χημική απαίτηση σε οξυγόνο),

C_T = τιμές DOC ή COD στο μείγμα της δοκιμασίας, τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_B = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας τη στιγμή της δειγματοληψίας (mg/l),

C_{BA} = τιμή DOC ή COD της τυφλής δοκιμασίας, η μέτρηση της οποίας έχει γίνει τρεις ώρες μετά από την έναρξη της δοκιμασίας (mg/l).

Ο αριθμός που εκφράζει το ύψος της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα.

Η εκατοστιαία αποικοδόμηση εκφράζεται σε επί τους εκατό DOC (ή COD) απώλεια της υπό δοκιμασία ουσίας.

Η διαφορά μεταξύ της τιμής που μετρήθηκε μετά από τρεις ώρες και της αρχικής τιμής που έχει υπολογιστεί —ή καλύτερα μετρηθεί— μπορεί να παράσχει χρήσιμα στοιχεία για την αποικοδόμηση της ουσίας (βλέπε σημείο 3.2 «Ερμηνεία των αποτελεσμάτων»).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Σε μερικές περιπτώσεις ανάλυσης νέων ουσιών είναι χρήσιμη η παρουσία ουσιών αναφοράς. Ωστόσο δεν είναι ακόμη δυνατόν να διατυπωθούν συστάσεις για συγκεκριμένης ουσίες αναφοράς.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Οι ενεργοποιημένες ιλύες, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και το υλικό της δοκιμασίας σε υδατικό διάλυμα ως αποκλειστική πηγή άνθρακα τοποθετούνται μαζί σε υάλινο δοχείο χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων, το οποίο φέρει αναδευτήρα και συσκευή για την εισπίεση αέρα. Αναδεύεται το μείγμα και διοχετεύεται αέρας σε 20 έως 25 °C, υπό διάχυτο φωτισμό ή σε σκοτεινό θάλαμο επί 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο. Η διαδικασία αποικοδόμησης παρακολουθείται προσδιορίζοντας τις τιμές DOC (ή COD) στο διηθηθέν διάλυμα, καθημερινά ή ανά τακτά διαστήματα. Η αναλογία του αποικοδομούμενου DOC (ή COD), μετά από κάθε ανάπαυλα, προς την τιμή της μέτρησης που διενεργείται τρεις ώρες μετά από την έναρξη εκφράζεται ως ποσοστό βιοαποικοδόμησης και χρησιμεύει ως μέτρο του βαθμού αποικοδομήσεως τη στιγμή εκείνη. Η σημείωση των αποτελεσμάτων αυτών σε σύστημα συντεταγμένων σε συνάρτηση με τον παράγοντα χρόνος παρέχει την καμπύλη βιοαποικοδόμησης.

Όταν χρησιμοποιείται μια ειδική αναλυτική μέθοδος είναι δυνατόν να μετρηθούν οι μεταβολές της συγκέντρωσης της αρχικής ένωσης, οι οποίες οφείλονται στη βιοαποικοδόμηση (πρωτογενής βιοαποικοδόμηση).

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Σε ένα ring test αποδείχτηκε η αναπαραγωγιμότητα ικανοποιητική.

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό σταθερότητας της τυφλής δοκιμασίας και σε μικρότερο βαθμό από την ακρίβεια του προσδιορισμού του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα και το επίπεδο της ενώσεως της δοκιμασίας στο υγρό.

1.6. **Περιγραφή της διαδικασίας της δοκιμασίας**

1.6.1. *Προπαρασκευαστικές εργασίες*

1.6.1.1. Αντιδραστήρια

Νερό που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία: πόσιμο νερό με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα μικρότερη των 5 mg/l. Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου μαζί δεν πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο των 2,7 mmole/l. Στην περίπτωση που δεν τηρηθεί το όριο αυτό απαιτείται αραίωση με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.

Θειικό οξύ αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 50 g/l.

Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 40 g/l.

Ανόργανο θρεπτικό διάλυμα: διαλύονται σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού:

χλωριούχο αμμώνιο, NH_4CL, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 38,5 g,

δισόξινο φωσφορικό νάτριο, $N_aH_2PO_4.2H_2O$, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 33,4 g,

δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 8,5 g,

μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας: 21,75 g.

Το μείγμα χρησιμεύει τόσο ως θρεπτικό όσο και ως ρυθμιστικό διάλυμα.

1.6.1.2. Όργανα

Υάλινα δοχεία χωρητικότητας 1 έως 4 λίτρων (π.χ. κυλινδρικά δοχεία).

Αναδευτήρας με υάλινο ή μεταλλικό βραχίονα αναδεύσεως σε κατάλληλο στέλεχος (ο βραχίονας πρέπει να περιστρέφεται σε ύψος 5 έως 10 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά μαγνητικός αναδευτήρας μήκους 7 έως 10 cm.

Υάλινος σωλήνας εσωτερικής διαμέτρου 2 έως 4 mm για την εισαγωγή αέρα. Το στόμιο του σωλήνα πρέπει να είναι σε ύψος 1 cm περίπου από τον πυθμένα του δοχείου.

Συσκευή φυγοκεντρήσεως (περίπου 3 550 g).

pH-μέτρο.

Μετρητής του διαλελυμένου οξυγόνου.

Χάρτινοι ηθμοί.

Συσκευή διηθήσεως με μεμβράνη.

Μεμβράνες διηθήσεως, μεγέθους πόρου 0,45 μm. Οι μεμβράνες διηθήσεως είναι κατάλληλες εφόσον αποδεδειγμένα δεν αποδεσμεύουν άνθρακα ούτε απορροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διηθήσεως.

Αναλυτικός εξοπλισμός για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα και της χημικής απαίτησης σε οξυγόνο.

1.6.1.3. Παρασκευή του εμβολίου

Η ενεργοποιημένη ιλύς που λαμβάνεται από σταθμό βιολογικής κατεργασίας εκπλύσεται με τη βοήθεια (επανειλημμένων) φυγοκεντρήσεων ή καθιζήσεως με νερό κατάλληλο για τη δοκιμασία (ανωτέρω).

Η ενεργοποιημένη ιλύς πρέπει να είναι σε κατάλληλη κατάσταση. Τέτοια ιλύς μπορεί να ληφθεί από ένα σταθμό επεξεργασίας λυμάτων που λειτουργεί κανονικά. Προκειμένου η ποικιλία των βακτηριακών ειδών ή στελεχών να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη, ίσως είναι προτιμότερο να αναμειγνύονται υλικά ενοφθαλμισμού διαφορετικής προελεύσεως (π.χ. από διαφορετικούς σταθμούς κατεργασίας, δείγματα εδάφους, ποτάμια νερά κλπ.). Το μείγμα υφίσταται επεξεργασία όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Για τον έλεγχο της δραστικότητας της ενεργοποιημένης ιλύος βλέπε «Λειτουργικός έλεγχος» παρακάτω.

1.6.1.4. Παρασκευή των διαλυμάτων της δοκιμασίας

Στο δοχείο της δοκιμασίας προστίθενται 500 ml κατάλληλου για τη δοκιμασία νερού, 2,5 ml/l ανόργανου θρεπτικού διαλύματος και ενεργοποιημένη ιλύς σε τιμή που αντιστοιχεί σε 0,2 έως 1,0 g/l ξηρής ύλης στο τελικό μείγμα. Προστίθεται επαρκώς ποσότης αποθέματος διαλύματος της υπό δοκιμασία ουσίας μέχρις ότου επιτευχθεί στο τελικό μείγμα συγκέντρωση DOC 50 έως 400 mg/l. Οι αντίστοιχες τιμές COD είναι 100 έως 1 000 mg/l. Προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι τελικού συνολικού όγκου 1 έως 4 λίτρων. Ο καθορισμός του τελικού όγκου εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που λαμβάνονται για προσδιορισμό του DOC ή του COD, καθώς και από τους όγκους που είναι αναγκαίοι για τη διεξαγωγή της ανάλυσης.

Συνήθως ένας όγκος δύο λίτρων μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικός.

Σε κάθε σειρά δοκιμασιών ακολουθείται παράλληλη διαδικασία για ένα τουλάχιστον δοχείο-μάρτυρα (τυφλή δοκιμασία). Το δοχείο αυτό περιέχει αποκλειστικά ενεργοποιημένη ιλύ και ανόργανο θρεπτικό διάλυμα, όπου προστίθεται κατάλληλο για τη δοκιμασία νερό μέχρι συνολικού όγκου ισοδύναμου με αυτόν των δοχείων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία.

1.6.2. *Διεξαγωγή της δοκιμασίας*

Το περιεχόμενο των δοχείων της δοκιμασίας αναδεύεται με μαγνητικούς αναδευτήρες ή έλικες υπό συνθήκες διάχυτου φωτισμού ή σε σκοτεινό θάλαμο σε θερμοκρασία 20 έως 25 °C. Ο αερισμός εξασφαλίζεται με τη διοχέτευση αέρα υπό πίεση ο οποίος καθαρίζεται με ηθμό από βαμβάκι ή και με φιάλη εκπλύσεως, εφόσον αυτό είναι αναγκαίο. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι η ιλύς δεν θα καθιζάνει και ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν θα πέσει σε επίπεδα χαμηλότερα των 2 mg/l.

Η τιμή του pH πρέπει να ελέγχεται τακτικά (π.χ. καθημερινά) και εφόσον αυτό είναι αναγκαίο να διορθώνεται σε pH 7 έως 8.

Οι απώλειες από την εξάτμηση αναπληρώνονται πριν από κάθε δειγματοληψία με τις απαιτούμενες ποσότητες απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Μια καλή μέθοδος είναι να σημειώνεται η στάθμη του υγρού στο δοχείο πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Μετά από κάθε δειγματοληψία σημειώνεται η νέα στάθμη (χωρίς αερισμό και ανάδευση). Τα πρώτα δείγματα λαμβάνονται πάντοτε τρεις ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας προκειμένου να εντοπισθεί η προσρόφηση υλικού της δοκιμασίας από την ενεργοποιημένη ιλύ.

Η εξάλειψη του υλικού της δοκιμασίας απολουθείται από προσδιορισμούς DOC ή COD που διεξάγονται σε καθημερινή ή σε κάποια άλλη τακτική βάση. Τα δείγματα από το δοχείο της δοκιμασίας και από αυτό της τυφλής δοκιμασίας διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού. Τα πρώτα 5 ml του διαλύματος-διηθήματος της δοκιμασίας απομακρύνονται. Οι ιλύες που είναι δύσκολο να διηθηθούν μπορούν να αφαιρεθούν προηγουμένως διά φυγοκεντρήσεως επί 10 λεπτά. Οι προσδιορισμοί DOC και COD πραγματοποιούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Η δοκιμασία διεξάγεται επό 28 ημέρες κατά μέγιστο όριο.

Σημείωση: Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια ηθμών από μεμβράνη. Οι ηθμοί από μεμβράνη πρέπει να μην αποδεσμεύουν ή προσροφούν οργανικές ύλες.

Λειτουργικός έλεγχος της ενεργοποιημένης ιλύος

Παράλληλα με κάθε σειρά δοκιμασιών πρέπει να διεξάγεται και μια δοκιμασία με δοχείο που περιέχει γνωστή ουσία, προκειμένου να ελέγχεται η λειτουργική αποδοτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος. Η διαιθυλενογλυκόλη έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για το σκοπό αυτό.

Προσαρμογή των μικροοργανισμών

Εφόσον τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν μεταξύ των αναλύσεων είναι σχετικά μικρά (π.χ. εφόσον διεξάγονται καθημερινά), η προσαρμογή των μικροοργανισμών μπορεί να αναγνωριστεί σαφώς από την καμπύλη αποικοδομήσεως (βλέπε σχήμα 2). Κατά συνέπεια η δοκιμασία δεν πρέπει να αρχίζει αμέσως πριν το Σαββατοκύριακο.

Στην περίπτωση που η προσαρμογή πραγματοποιείται στο τέλος της περιόδου, η δοκιμασία μπορεί να παραταθεί μέχρις ότου περατωθεί η διάσπαση.

Σημείωση: Εφόσον απαιτείται ευρύτερη γνώση της συμπεριφοράς της ιλύος, η ίδια ενεργοποιημένη ιλύς εκτίθεται για άλλη μια φορά στο ίδιο υλικό της δοκιμασίας, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

Σταματάμε τη λειτουργία του αναδευτήρα και της συσκευής για την εισπίεση αέρα και αφήνουμε την ενεργοποιημένη ιλύ σε ηρεμία ώστε να καθιζάνει.

Απομακρύνουμε το επιπλέον υγρό, προσθέτουμε νερό της δοκιμασίας μέχρι τελικού όγκου δύο λίτρων, αναδεύουμε επί 15 λεπτά και αφήνουμε ξανά το σύστημα να ηρεμήσει. Μόλις απομακρυνθεί εκ νέου το επιπλέον υγρό χρησιμοποιείται ή εναπομένουσα ιλύς για να επαναληφθεί η δοκιμασία με το ίδιο υλικό σύμφωνα με τα σημεία 1.6.1.4 και 1.6.2. Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί επίσης να απομονωθεί με φυγοκέντρηση αντί της καθίζησης.

Η προσαρμοσμένη ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με νωπή ιλύ μέχρι 0,2 έως 1 g βάρους ξηράς ουσίας/λίτρο κατά μέγιστο όριο.

Αναλυτικά μέσα

Κατά κανόνα τα δείγματα διηθούνται με τη βοήθεια προσεκτικά εκπλυθέντος χάρτινου ηθμού (για την έκπλυση χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό).

Τα δείγματα που παραμένουν θολά διηθούνται με τη βοήθεια μεμβρανών διηθήσεως (0,45 μm).

Η συγκέντρωση DOC προσδιορίζεται εις διπλούν στα διηθήματα του δείγματος (τα πρώτα 5 ml απομακρύνονται) με τη βοήθεια οργάνου TOC. Στην περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να υποβληθεί αυθημερόν σε ανάλυση το διήθημα, φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι την επομένη ημέρα. Η περαιτέρω φύλαξη δεν συνιστάται.

Η συγκέντρωση COD προσδιορίζεται στα διηθήματα δείγματος με τη βοήθεια των οργάνων μετρήσεως του COD, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην παραπομπή (2), κατωτέρω.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Οι συγκεντρώσεις DOC και COD στα δείγματα προσδιορίζονται τουλάχιστον δύο φορές, σύμφωνα με το σημείο 1.6.2 ανωτέρω. Η αποικοδόμηση κατά τον χρόνο T υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο (με τους ορισμούς) που αναφέρεται στο σημείο 1.2 ανωτέρω.

Ο αριθμός που εκφράζει την έκταση της αποικοδόμησης στρογγυλεύεται στην πλησιέστερη ακέραια εκατοστιαία μονάδα. Η αποικοδόμηση που έχει συντελεστεί στο τέλος της δοκιμασίας αποδίδεται ως «Βιοαποικοδομητικότητα στη δοκιμασία Zahn-Wellens».

Σημείωση: Στην περίπτωση που η αποικοδόμηση ολοκληρωθεί πρίν από τη λήξη του χρόνου της δοκιμασίας, και το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιωθεί με δεύτερη ανάλυση που διενεργείται την επομένη, η δοκιμασία μπορεί να περατωθεί.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

— την αρχική συγκέντρωση της ουσίας,

— κάθε άλλη πληροφορία καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την υπό δοκιμασία ουσία, την ουσία αναφοράς —εφόσον χρησιμοποιείται— και αυτήν της τυφλής δοκιμασίας,

— τη συγκέντρωση μετά από τρεις ώρες,

— την καμπύλη βιοαποικοδόμησης, με περιγραφή,

— την ημερομηνία και τον τόπο δειγματοληψίας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία, το βαθμό προσαρμογής, τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση κλπ.,

— τους επιστημονικούς λόγους της τυχόν μεταβολής της διαδικασίας της δοκιμασίας.

3.2. **Ερμηνεία την αποτελεσμάτων**

Η βαθμιαία απώλεια του DOC (COD) σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων αποτελεί ένδειξη ότι η υπό δοκιμασία ουσία βιοαποικοδομείται.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, η φυσικοχημική προσρόφηση μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο και αυτό φαίνεται όταν σημειώνεται ολική ή επιμέρους απώλεια από την αρχή, εντός των τριών πρώτων ωρών, και η διαφορά μεταξύ επιπλεόντων υγρών μαρτύρων και αυτών της δοκιμασίας κυμαίνεται σε μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα.

Για να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης (ή μερικής βιοαποικοδόμησης) και προσρόφησης είναι αναγκαίο να διενεργούνται περαιτέρω δοκιμασίες.

Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ο εγκυρότερος των οποίων είναι να χρησιμοποιηθεί το επιπλέον υγρό ως υλικό εμβολιασμού σε βασική δοκιμασία (κατά προτίμηση σε δοκιμασία με αναπνοόμετρο).

Υπό δοκιμασία ουσίες με υψηλή απώλεια DOC (COD) που δεν οφείλεται σε προσρόφηση πρέπει να θεωρούνται ως ενδεχομένως βιοαποικοδομήσιμες. Η ύπαρξη μερικής, μη οφειλόμενης σε προσρόφηση απώλειας αποτελεί ένδειξη ότι η χημική ουσία υπόκειται τουλάχιστον σε κάποιας έκτασης βιοαποικοδόμηση. Η ύπαρξη χαμηλής ή μηδενικής απώλειας DOC (COD) μπορεί να οφείλεται σε ανασταλτική δράση της υπό δοκιμασία ουσίας στους μικροοργανισμούς, και αυτό μπορεί επίσης να διαπιστωθεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, γεγονός που οδηγεί σε θολά επιπλέοντα υγρά. Στη περίπτωση αυτή η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ουσία χαμηλότερης περιεκτικότητας.

Η χρησιμοποίηση μιας ειδικής για τη συγκεκριμένη ένωση αναλυτικής μεθόδου ή σεσημασμένης με ^{14}C ουσίας της δοκιμασίας μπορεί να επιτρέψει την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμασία ένωση σεσημασμένη με ^{14}C, η ανάκτηση $^{14}CO_2$ θα επιβεβαιώσει ότι συντελέστηκε βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε πρωτογενή βιοαποικοδόμηση, πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να δοθεί κάποια εξήγηση για τη μεταβολή της χημικής δομής που οδηγεί σε έλλειψη ανταποκρίσεως εκ μέρους της αρχικής ουσίας της δοκιμασίας.

Η κατοχύρωση της εγκυρότητας της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να γίνεται μαζί με την ανταπόκριση που διαπιστώνεται σε μέσο όπου διεξάγεται τυφλή δοκιμασία.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 302 B*, απόφαση του Συμβουλίου C(81)30 τελικό.

(2) Παράρτημα V C.9 Αποικοδόμηση: Χημική απαίτηση σε οξυγόνο, οδηγία 84/449/ΕΟΚ της Επιτροπής, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 251 της 19. 9. 1984.

Προσάρτημα

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΚΤΙΜΗΣΕΩΣ

Οργανική ένωση: 4-Αιθοξυβενζοϊκό οξύ
Θεωρητική συγκέντρωση της δοκιμασίας: 600 mg/l
Θεωρητικός DOC: 390 mg/l

Υλικό εμβολιασμού: Σταθμός κατεργασίας αποβλήτων . . .
Συγκέντρωση: 1 g ξηράς ουσίας λίτρο
Βαθμός προσαρμογής: μη προσαρμοσμένη

Ανάλυση: Προσδιορισμός DOC

Ποσότητα δείγματος: 3 ml

Ουσία-μάρτυρας: Διαιθυλενογλυκόλη

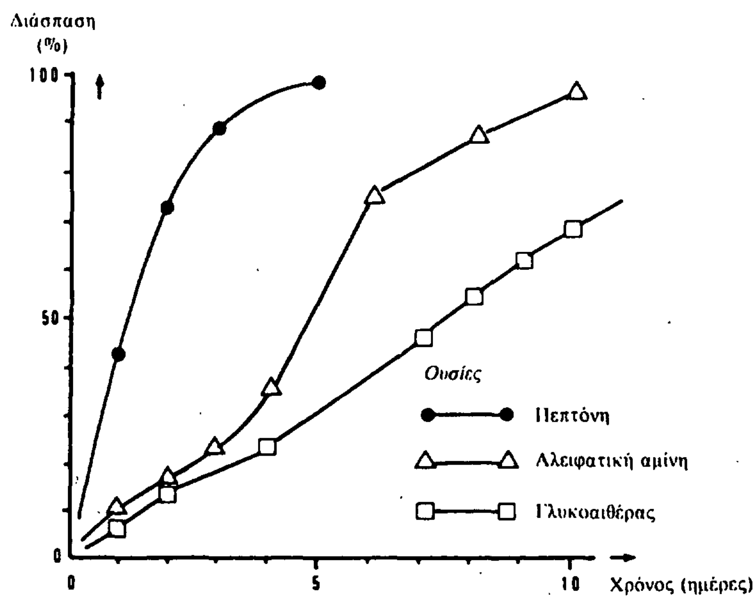
Τοξικότητα ενώσεως: Δεν εμφανίζει τοξικότητα κάτω των 1 000 mg/l
Χρησιμοποιούμενη δοκιμασία:
Δοκιμασία ζυμώσεως σε σωλήνα

Χρόνος δοκιμασίας	Ουσία μάρτυρας				Ουσία δοκιμασίας		
	Τυφλό DOC (¹) mg/l	DOC (¹) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %	DOC (¹) mg/l	DOC καθαρό mg/l	Διάσπαση %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ώρες	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ημέρα	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ημέρες	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ημέρες	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ημέρες	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ημέρες	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ημέρες	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ημέρες	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ημέρες	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(¹) Μέσες τιμές τριπλών προσδιορισμών.

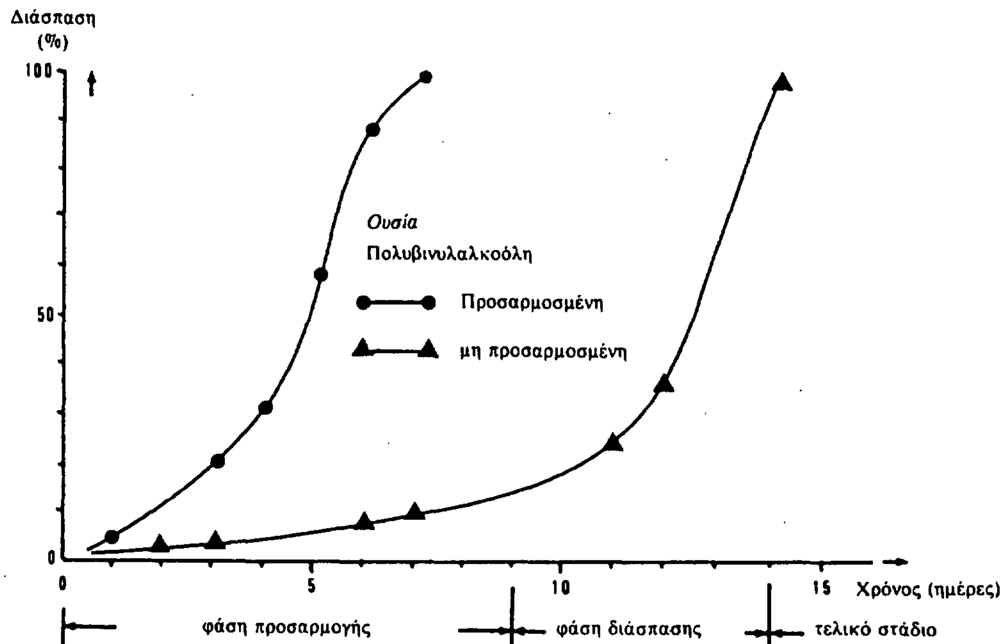
Σχήμα 1

Παραδείγματα καμπυλών βιοαποικοδόμησης



Σχήμα 2

Παραδείγματα προσαρμογής ιλύος



ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΙΛΥΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

1.1.1. *Γενικές παρατηρήσεις*

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί μόνο για τις οργανικές ουσίες που, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στην δοκιμασία:

— είναι υδατοδιαλυτές στο βαθμό που απαιτείται για την παράσκευή των διαλυμάτων ελέγχου,

— έχουν αμελητέα τάση ατμών στις συνθήκες της δοκιμασίας,

— δεν αναστέλλουν τα βακτηρίδια.

Οι πληροφορίες για τις σχετικές αναλογίες των κύριων συστατικών του υλικού ελέγχου θα είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που θα ληφθούν, ιδίως στις περιπτώσεις που τα αποτελέσματα είναι χαμηλά ή οριακά.

Οι πληροφορίες για την τοξικότητα της ουσίας στους μικροοργανισμούς κρίνονται επιθυμητές για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.1.2. *Προσδιορισμός της τελικής βιοαποικοδομητικότητας (ανάλυση DOC/COD)*

Σκοπός της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της τελικής βιοαποικοδομητικότητας με μέτρηση της απομάκρυνσης της ουσίας και οποιωνδήποτε μεταβολιτών σε ένα μοντέλο εγκατάστασης ενεργοποιημένης ιλύος, σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε > 12 mg DOC/l (ή περίπου 40 mg COD/l). Τα 20 mg DOC/l θεωρούνται ως βέλτιστη συγκέντρωση. (DOC = διαλυμένος οργανικός άνθρακας, COD = χημική απαίτηση οξυγόνου).

Η περιεκτικότητα του υλικού ελέγχου σε οργανικό άνθρακα (ή η χημική απαίτηση οξυγόνου) πρέπει να καθορίζονται.

1.1.3. *Προσδιορισμός της αρχικής βιοαποικοδομητικότητας (ειδική ανάλυση)*

Σκοπός της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της αρχικής βιοαποικοδομητικότητας μιας ουσίας σε ένα μοντέλο εγκατάστασης ενεργοποιημένης ιλύος, σε συγκέντρωση 20 mg/l περίπου, με τη βοήθεια ειδικής αναλυτικής μεθόδου (μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις αν το επιτρέπουν ή αναλυτική μεθοδος και η εκτίμηση της τοξικότητας). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να υπολογιστεί η αρχική βιοαποικοδομητικότητα της ουσίας (εξαφάνιση της μητρικής χημικής δομής).

Σκοπός της μεθόδου αυτής *δεν* είναι ο προσδιορισμός της μετατροπής της ελεγχόμενης ουσίας σε ανόργανη.

Πρέπει να υπάρχει κατάλληλη αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

1.2.1. *Ανάλυση DOC/COD*

Ο βαθμός απομάκρυνσης της ουσίας δίνεται από τη σχέση:

$$DR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\% \qquad [1\ (\alpha)]$$

όπου:

DR = βαθμός απομάκρυνσης σε % DOC (ή COD) μέσα στο δεδομένο μέσο χρόνο κατακράτησης σε σχέση με το υλικό ελέγχου,

T = συγκέντρωση του υλικού ελέγχου στο εισρέον υλικό, σε mg DOC/l (ή mg COD/l),

E = συγκέντρωση DOC (ή COD) στα απόβλητα της μονάδας ελέγχου, σε mg DOC/l (ή mg COD/l),

E_O = συγκέντρωση DOC (ή COD) στα απόβλητα της μονάδας τυφλού προσδιορισμού σε mg DOC/l (ή mg COD/l).

Η αποικοδόμηση εκφράζεται ως το εκατοστιαίο ποσοστό απομάκρυνσης του DOC (ή COD) μέσα στο δεδομένο χρόνο κατακράτησης σε σχέση με το υλικό ελέγχου.

1.2.2. *Ειδική ανάλυση*

Η επί τοις εκατό απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση (R_W) μέσα στο δεδομένο μέσο χρόνο κατακράτησης, δείνεται από τη σχέση:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\% \qquad [1 (\beta)]$$

όπου:

C_I = συγκέντρωση της ουσίας στο εισρέον υλικό της μονάδας ελέγχου (mg ουσίας/l, προσδιορίζεται με ειδική ανάλυση),

C_O = συγκέντρωση της ουσίας στα απόβλητα της μονάδας ελέγχου (mg ουσίας/l, προσδιορίζεται με ειδική ανάλυση).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Σε μερικές περιπτώσεις, κατά τον έλεγχο μιας νέας ουσίας, οι ουσίες αναφοράς μπορεί να είναι χρήσιμες, δεν είναι πάντως ακόμα δυνατόν να προταθούν συγκεκριμένες ουσίες αναφοράς.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Για τον προσδιορισμό της τελικής βιοαποικοδομητικότητα τίθενται σε παράλληλη λειτουργία δύο δοκιμαστικές μονάδες ενεργοποιημένης ιλύος (μονάδες δοκιμών επικύρωσης, ΟΟΣΑ, ή μονάδες πορώδους δοχείου). Η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται στο υλικό που εισρέει στη μια από τις μονάδες (σύνθετικά ή οικιακά λύματα) ενώ η άλλη δέχεται μόνο τα λύματα. Για τον προσδιορισμό της αρχικής βιοαποικοδόμησης, με ειδική ανάλυση στο εισρέον υλικό και στα απόβλητα, χρησιμοποιείται μόνο μία μονάδα.

Μετριούνται οι συγκεντρώσεις DOC (ή COD) στα απόβλητα ή προσδιορίζονται με ειδική ανάλυση οι συγκεντρώσεις της ουσίας.

Η περιεκτικότητα DOC που οφείλεται στο υλικό ελέγχου δεν μετριέται αλλά απλώς αναφέρεται.

Όταν διεξάγονται μετρήσεις DOC (ή COD), θεωρείται ότι η διαφορά στις μέσες συγκεντρώσεις μεταξύ των αποβλήτων ελέγχου και του μάρτυρα οφείλεται σε υλικό ελέγχου που δεν αποικοδομείται.

Όταν διεξάγονται ειδικές αναλύσεις μπορεί να μετρηθεί η μεταβολή στη συγκέντρωση του μητρικού μορίου (αρχική βιοαποικοδόμηση).

Οι μονάδες μπορούν να λειτουργήσουν με τη «μέθοδο των συζευγμένων μονάδων» με διαδικασία διενοφθαλμισμού.

1.5. **Ποιοτικά κριτήρια**

Η αρχική συγκέντρωση της ουσίας εξαρτάται από το είδος της ανάλυσης που διεξάγεται και τους περιορισμούς της.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

1.6.1. *Προετοιμασία*

1.6.1.1. Εξοπλισμός

Απαιτείται ζεύγος μονάδων του ίδιου τύπου εκτός από την περίπτωση που διεξάγονται ειδικές αναλύσεις. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο τύποι διατάξεων:

Δοκιμή επικύρωσης ΟΟΣΑ

Ο εξοπλισμός (προσάρτημα I) αποτελείται από δοχείο αποθήκευσης (A) για συνθετικά λύματα, αντλία δοσιμετρική (B), δοχείο αερισμού (C), διαχωριστήρα (D), αντλία πεπιεσμένου αέρα (E) για την ανακύκλωση της ενεργοποιημένης ιλύος και δοχείο (F) για τη συλλογή των αποβλήτων μετά τον καθαρισμό.

Τα δοχεία (A) και (F) πρέπει να είναι γυάλινα ή από κατάλληλο πλαστικό και να έχουν χωρητικότητα τουλάχιστον 24 λίτρων. Η αντλία (B) πρέπει να παρέχει σταθερή ροή συνθετικών λυμάτων στο δοχείο αερισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο σύστημα, με την προϋπόθεση ότι θα εξασφαλίζεται η ροή και η συγκέντρωση τροφοδότησης.

β) Σύνθετο εμβόλιο

Εμβόλιο από δευτερογενή απόβλητα:

Βλέπε περιγραφή παραπάνω.

Εμβόλιο από χώμα:

Σχηματίζεται εναιώρημα με 100 g από χώμα κήπου (γόνιμο, όχι στείρο) σε 1000 ml πόσιμου νερού απαλλαγμένου από χλώριο. (Χώμα με εξαιρετικά μεγάλη αναλογία αργίλου, άμμου ή χούμου είναι ακατάλληλο.) Μετά την ανάδευση το εναιώρημα αφήνεται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο διηθείται με χονδρό ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα αερίζεται αμέσως και μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής.

Εμβόλιο από επιφανειακά νερά

Ένα ακόμα μερικό εμβόλιο λαμβάνεται από μεσοσαπρόβια επιφανειακά νερά. Το δείγμα διηθείται με χονδρό ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής.

Ίσοι όγκοι από τα τρία αυτά μερικά δείγματα εμβολίου ενώνονται, αναμειγνύονται καλά και, από το μείγμα αυτό, λαμβάνεται το τελικό εμβόλιο.

Απαιτούνται τουλάχιστον 3 ml για το εμβόλιο.

γ) Εμβόλιο από ενεργοποιημένη ιλύ

Ένας όγκος (όχι περισσότερο από 3 l) ενεργοποιημένης ιλύος (περιεκτικότητα σε αιωρούμενα στερεά μέχρι 2,5 g/l) που έχει ληφθεί από τη δεξαμενή αερισμού μιας εγκατάστασης καθαρισμού οικιακών κυρίως λυμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ενοφθάλμισμα.

1.6.2. *Τρόπος εργασίας*

Η δοκιμασία διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου που πρέπει να διατηρείται μεταξύ 18 °C και 25 °C.

Η δοκιμασία μπορεί να διεξαχθεί και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (μέχρι 10 °C): αν η ουσία αποικοδομείται, τότε κανονικά δεν απαιτείται συνέχιση της εργασίας. Αν όμως η ουσία δεν έχει αποικοδομηθεί, η δοκιμασία πρέπει να πραγματοποιηθεί σε σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 18 °C και 25 °C.

1.6.2.1. Περίοδος κανονικής λειτουργίας: Σχηματισμός ιλύος/σταθεροποίηση των μονάδων

Περίοδος ανάπτυξης της ιλύος/σταθεροποίησης είναι η περίοδος κατά την οποία η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών στην ενεργό ιλύ και η απόδοση των μονάδων οδηγούνται σε κατάσταση ισορροπίας στις συνθήκες λειτουργίας που εφαρμόζονται.

Περίοδος κανονικής λειτουργίας είναι η περίοδος που διαρκεί από το χρόνο της πρώτης προσθήκης της ελεγχόμενης ουσίας μέχρι το χρόνο που η απομάκρυνσή της φτάνει σε πλατό (σχετικά σταθερή τιμή). Η περίοδος αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τις έξι εβδομάδες.

Η περίοδος αξιολόγησης διαρκεί τρεις εβδομάδες από τη στιγμή που η απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας φτάνει σε μια σχετικά σταθερή, και συνήθως υψηλή, τιμή. Για τις ουσίες που αποικοδομούνται λίγο ή καθόλου τις πρώτες έξι εβδομάδες, ως περίοδος αξιολόγησης λαμβάνονται οι επόμενες τρεις εβδομάδες.

Κατ' αρχήν γεμίζεται(ονται) η(οι) μονάδα(ες) που απαιτείται(ούνται) για μια δοκιμασία με το ενοφθάλμισμα αναμειγμένο με εισρέον υλικό.

Ο ανεμιστήρας [και η αντλία πεπιεσμένου αέρα (E) στην περίπτωση των μονάδων δοκιμών επικύρωσης ΟΟΣΑ] καθώς και η διάταξη δοσολογίας (B) μπαίνουν σε λειτουργία.

Το εισρέον υλικό χωρίς την ελεγχόμενη ουσία πρέπει να περνά μέσα από το δοχείο αερισμού (C) με ταχύτητα είτε ενός λίτρου ανά ώρα είτε μισού λίτρου ανά ώρα. Αυτό συνεπάγεται μέσο χρόνο κατακράτησης 3 ή 6 ώρες αντίστοιχα.

Η ταχύτητα αερισμού θα πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε το περιεχόμενο του δοχείου (C) να διατηρείται σταθερά σε αιώρηση ενώ η περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο να είναι τουλάχιστον 2 mg/l.

Πρέπει να εμποδίζεται το άφρισμα με κατάλληλα μέσα. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιαφριστικοί παράγοντες που δρουν παρεμποδιστικά στην ενεργοποιημένη ιλύ. Η ιλύς που συσσωρεύεται γύρω από την κορυφή του δοχείου αερισμού (C) [και, στην περίπτωση των μονάδων δοκιμών επικύρωσης ΟΟΣΑ, στη βάση του δοχείου καθίζησης (D) και στο κύκλωμα κυκλοφορίας] πρέπει να επαναφέρεται στο αναμειγμένο υγρό τουλάχιστον μία φορά την ημέρα με βούρτσισμα ή άλλο κατάλληλη τρόπο.

Όταν η ιλύς δεν καθιζάνει, η πυκνότητά της μπορεί να αυξηθεί με τον προσθήκη δόσεων των 2 ml από διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου 5 %, όσες φορές χρειάζεται.

Τα απόβλητα συλλέγονται σε δοχείο (E ή F) επί 20 μέχρι 24 ώρες και λαμβάνεται δείγμα μετά από καλή ανάμειξη. Το δοχείο (E ή F) πρέπει να καθαρίζεται με προσοχή.

Για να ελέγχεται και να παρακαλουθείται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, μετριέται, τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα, η χημική απαίτηση σε οξυγόνο (COD) ή ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) του διηθήματος από τα συσσωρευμένα απόβλητα καθώς και του διηθημένου εισρέοντος υλικού [με τη βοήθεια μεμβράνης με μέγεθος πόρων 45 μm, τα πρώτα 20 ml του διηθήματος (κατά προσέγγιση) απορρίπτονται].

Κατά τη διάρκεια της κανονικής λειτουργίας, το ύψος του διαχωριστήρα (D) ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε το δοχείο αερισμού να περιέχει όγκο τριών λίτρων ανεμεμειγμένου υγρού. Ένας πορώδης κύβος για αερισμό (G) αιωρείται στο δοχείο (C), στην κορυφή του κώνου. Η ποσότητα του αέρα που εμφυσάται μέσω του ανεμιστήρα μπορεί να ελέγχεται με τη βοήθεια ενός μετρητή ροής. Η αντλία πεπιεσμένου αέρα (E) ρυθμίζεται με τρόπο ώστε η ενεργός ιλύς από το διαχωριστήρα να ανακυκλώνεται συνεχώς και αρμονικά προς το δοχείο αερισμού (C).

«Πορώδες δοχείο»

Το πορώδες δοχείο είναι κατασκευασμένο από φύλλα πορώδους πολυαιθυλενίου (πάχος 2 mm, μέγιστο μέγεθος πόρων 95 μm) διαμορφωμένα σε κυλίνδρους διαμέτρου 14 cm με κωνική βάση στις 45° (σχήμα 1 και 2 του προσαρτήματος 2). Το πορώδες δοχείο περιέχεται σε αδιαπέραστο δοχείο από κατάλληλο πλαστικό με διάμετρο 15 cm και με μια έξοδο σε ύψος 17,2 cm στο κυλινδρικό μέρος, που καθορίζει τον όγκο (3 l) στο δοχείο. Γύρω από την κορυφή του εσωτερικού δοχείου υπάρχει άκαμπτος δακτύλιος στήριξης, κατασκευασμένος από κατάλληλο πλαστικό, ώστε να δημιουργείται διάστημα εκροής 0,5 cm ανάμεσα στο εσωτερικό και το εξωτερικό δοχείο.

Τα πορώδη δοχεία μπορούν να στερεωθούν στη βάση ενός θερμοστατούμενου υδατόλουτρου. Η παροχή αέρα γίνεται από τη βάση του εσωτερικού δοχείου, όπου έχουν τοποθετηθεί κατάλληλες διατάξεις διάχυσης.

Τα δοχεία (A) και (E) πρέπει να είναι γυάλινα ή από κατάλληλο πλαστικό και να έχουν χωρητικότητα τουλάχιστον 24 λίτρων. Η αντλία (B) πρέπει να παρέχει σταθερή ροή συνθετικών λυμάτων στο δοχείο αερισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο σύστημα, με την προϋπόθεση ότι θα εξασφαλίζεται η ροή και η συγκέντρωση τροφοδότησης.

Απαιτούνται ανταλλακτικά εσωτερικά πορώδη δοχεία για την αντικατάσταση αυτών που τυχόν θα αποφραχθούν κατά τη χρήση. Τα δοχεία που αποφράζονται καθαρίζονται με εμβάπτιση σε υποχλωριώδες διάλυμα για 24 ώρες και κατόπιν καλό πλύσιμο με τρεχούμενο νερό.

1.6.1.2. Διήθηση

Απαιτούνται συσκευή διήθησης με μεμβράνες και διηθητικές μεμβράνες με μέγεθος πόρων 0,45 μm. Οι διηθητικές μεμβράνες θεωρούνται κατάλληλες αν εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε απορροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διήθησης.

1.6.1.3. Λύματα

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε συνθετική τροφή είτε οικιακά λύματα.

Παράδειγμα συνθετικής τροφής

Σε κάθε λίτρο νερού της βρύσης διαλύονται:

Πεπτόνη:	160 mg,
Εκχύλισμα κρέατος:	110 mg,
Ουρία:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg,
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Οικιακά λύματα

Θα πρέπει να είναι πρόσφατα, να συλλέγονται κάθε μέρα από το υπερχείλισμα της δεξαμενής προκαθαρισμού μιας εγκατάστασης καθαρισμού που επεξεργάζεται κυρίως οικιακά λύματα.

1.6.1.4. Μητρικό διάλυμα του υλικού ελέγχου

Παρασκευάζεται διάλυμα του υλικού ελέγχου, π.χ. 1%, για να προστεθεί στη μονάδα ελέγχου. Πρέπει να προσδιορίζεται η συγκέντρωση του υλικού ώστε να είναι γνωστός ο κατάλληλος όγκος που θα προστεθεί στα λύματα ή κατευθείαν στη μονάδα μέσω δεύτερης αντλίας για να επιτευχθεί η απαιτούμενη συγκέντρωση ελέγχου.

1.6.1.5. Εμβόλιο

Παρατήρηση: Όταν χρησιμοποιούνται οικιακά απόβλητα, δεν υπάρχει λόγος να χρησιμοποιείται εμβόλιο με χαμηλή βακτηριακή συγκέντρωση αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενεργοποιημένη ιλύς.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα εμβόλια.

Δίνονται τρία παραδείγματα κατάλληλου ενοφθαλμίσματος:

α) Εμβόλια από δευτερογενή απόβλητα

Το εμβόλιο λαμβάνεται από δευτερογενή απόβλητα καλής ποιότητας που συλλέγονται από μια εγκατάσταση καθαρισμού που προορίζεται κυρίως για οικιακά λύματα. Τα απόβλητα πρέπει να διατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες κατά την περίοδο μεταξύ δειγματοληψίας και χρησιμοποίησης. Για την παρασκευή του εμβολίου το δείγμα διηθείται με χονδρό ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής. Απαιτούνται τουλάχιστον 3 ml για τον εμβολιασμό.

Η μείωση του COD ή DOC θα πρέπει να είναι σταθερή όταν επιτυγχάνεται σχεδόν ομαλή καθημερινή αποικοδόμηση.

Η περιεκτικότητα σε ξηρή ύλη της ενεργοποιημένης ιλύος στη δεξαμενή αερισμού προσδιορίζεται δύο φορές την εβδομάδα (σε g/l). Οι μονάδες μπορούν να λειτουργούν με δύο τρόπους: είτε προσδιορίζεται δύο φορές την εβδομάδα η περιεκτικότητα της ενεργοποιημένης ιλύος σε ξηρή ύλη και, αν είναι μεγαλύτερη από 2,5 g/l, η περίσσεια της ενεργοποιημένης ιλύος πρέπει να απορρίπτεται είτε 500 ml αναμειγμένου υγρού αφήνονται καθημερινά να διαρρεύσουν από κάθε δοχείο ώστε να προκύψει μέσος χρόνος κατακράτησης της ιλύος για έξι ημέρες.

Όταν οι παράμετροι [αποτελεσματικότητα της διαδικασίας (σε απομάκρυνση DOC ή COD), συγκέντρωση της ιλύος, δυνατότητα καθίζησης της ιλύος, θολότητα των αποβλήτων κλπ.] που μετριούνται και υπολογίζονται για τις δύο μονάδες είναι αρκετά σταθερές, η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να ενσωματωθεί στο εισρέον υλικό μιας από τις μονάδες, σύμφωνα με το σημείο 1.6.2.2.

Εναλλακτικός τρόπος είναι να προστεθεί η ελεγχόμενη ουσία στην αρχή της περιόδου ανάπτυξης της ιλύος (σημείο 1.6.2.1), ιδίως όταν η ιλύς προστίθεται ως ενοφθάλμισμα.

1.6.2.2. Διαδικασία δοκιμασίας

Διατηρούνται οι συνθήκες λειτουργίας της περιόδου κανονικής λειτουργίας και προστίθεται στο εισρέον υλικό της μονάδας ελέγχου αρκετή ποσότητα μητρικού διαλύματος (περίπου 1 %) του υλικού ελέγχου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του υλικού ελέγχου στα λύματα (περίπου 10 έως 20 mg DOC/l ή 40 mg COD/l). Αυτό μπορεί να γίνει με καθημερινή ανάμειξη του μητρικού διαλύματος με τα λύματα ή με τη βοήθεια χωριστού συστήματος άντλησης. Η επιθυμητή συγκέντρωση μπορεί να επιτευχθεί προοδευτικά. Αν η ελεγχόμενη ουσία δεν έχει τοξική επίδραση στην ενεργοποιημένη ιλύ μπορούν να ελεγχθούν και μεγαλύτερες συγκεντώσεις.

Η μονάδα τυφλού προσδιορισμού τροφοδοτείται μόνο με εισρέον υλικό χωρίς την προσθήκη ουσιών. Λαμβάνονται για ανάλυση κατάλληλοι όγκοι από τα απόβλητα και διηθούνται με διηθητικές μεμβράνες (0,45 μm), ενώ τα πρώτα 20 ml του διηθήματος (κατά προσέγγιση) απορρίπτονται.

Τα διηθημένα δείγματα πρέπει να αναλύονται την ίδια ημέρα, διαφορετικά πρέπει να συντηρούνται με οποιαδήποτε κατάλληλη μέθοδο, για παράδειγμα, με τη χρησιμοποίηση 0,05 ml διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου ($HgCl_2$) 1 % για κάθε 10 ml του διηθήματος ή με φύλαξη στους 2 έως 4 °C μέχρι 24 ώρες ή κάτω από τους − 18 °C για μεγαλύτερες περιόδους.

Ο χρόνος εισροής με την προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας, δεν πρέπει να υπερβαίνει τις έξι εβδομάδες και η περίοδος αξιολόγησης θα πρέπει να είναι μικρότερη από τρεις εβδομάδες, δηλαδή για τον υπολογισμό του τελικού αποτελέσματος θα πρέπει να είναι διαθέσιμοι 14 έως 20 προσδιορισμοί.

Μέθοδος συζευγμένων μονάδων

Η σύζευξη των μονάδων γίνεται με ανταλλαγή ανάμεσα στις μονάδες 1,5 λίτρων αναμειγμένου υγρού (συμπεριλαμβανομένης και ιλύος) από τα δοχεία αερισμού της ενεργοποιημένης ιλύος, μια φορά την ημέρα. Σε περίπτωση υλικών ελέγχου με ισχυρή προσρόφηση, λαμβάνονται από τα δοχεία καθίζησης 1,5 λίτρα υπερκειμένου υγρού μόνο που χύνονται στο δοχείο της ενεργοποιημένης ιλύος της άλλης μονάδας.

1.6.2.3. Ανάλυση

Για την παρακολούθηση της συμπεριφοράς της ουσίας μπορούν να γίνουν δύο είδη ανάλυσης:

DOC και COD

Οι συγκεντρώσεις DOC προσδιορίζονται εις διπλούν με τον αναλυτή άνθρακα ή/και τις τιμές COD σύμφωνα με την παραπομπή (2).

Ειδική ανάλυση

Οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας προσδιορίζονται με κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Όταν είναι δυνατόν, θα πρέπει να γίνεται ειδικός προσδιορισμός της ουσίας που έχει προσροφηθεί στην ιλύ.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

2.1. Μέθοδος συζευγμένων μονάδων

Όταν χρησιμοποιείται η «μέθοδος συζευγμένων μονάδων», ο ημερήσιος βαθμός απομάκρυνσης DR υπολογίζεται σύμφωνα με το σημείο 1.2.1.

Οι τιμές αυτές για το βαθμό απομάκρυνσης DR διορθώνονται σε DRc για τη μεταφορά υλικού που οφείλεται στη διαδικασία διενοφθαλμισμού, με τη βοήθεια της εξίσωσης [2] ή της εξίσωσης [3] για μέσο χρόνο κατακράτησης τριών ή έξι ωρών αντίστοιχα.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \qquad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \qquad [3]$$

Υπολογίζεται ο μέσος όρος της σειράς των τιμών DRc καθώς και η τυπική απόκλιση σύμφωνα με την εξίσωση [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \qquad [4]$$

όπου:

S_{DRc} = τυπική απόκλιση της σειράς των τιμών DRc,

$\overline{DRc}$ = μέση τιμή του DRc,

n = αριθμός προσδιορισμών.

Οι ακραίες τιμές της σειράς DRc απαλείφονται σύμφωνα με κατάλληλη στατιστική μέθοδο, π.χ. Nalimov [6], στη στάθμη πιθανότητας 95 % και υπολογίζονται πάλι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων για το DRc.

Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με την εξίσωση [5].

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \qquad [5]$$

όπου:

$t_{n-1;\alpha}$ = τιμή πίνακα του t για n ζεύγη τιμών E και E_0 και στατιστική εμπιστοσύνη P (P = 1 – α) όπου P έχει οριστεί σε 95 % (1).

Το αποτέλεσμα αναφέρεται ως ο μέσος όρος με όρια ανοχής στη στάθμη εμπιστοσύνης 95 %, η αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ο αριθμός των δεδομένων της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων για το DRc και ο αριθμός των ακραίων τιμών, π.χ.:

DRc = 98,6 ± 2,3 % απομάκρυνση DOC,

S = 4,65 % απομάκρυνση DOC,

n = 18,

x = αριθμός ακραίων τιμών.

2.2. Μέθοδος μη συζευγμένων μονάδων

Η απόδοση των μονάδων μπορεί να ελεγχθεί ως εξής:

$$\frac{\text{\% απομάκρυνση}}{\text{COD ή DOC}} = \frac{\text{COD ή DOC των λυμάτων} - \text{COD ή DOC των αποβλήτων των μονάδων}}{\text{COD ή DOC των λυμάτων}} \times 100$$

Η καθημερινή αυτή απομάκρυνση μπορεί να παρασταθεί γραφικά ώστε να αποκαλυφθούν διάφορες τάσεις, π.χ. εγκλιματισμού.

2.2.1. *Χρησιμοποίηση των υπολογισμών* COD/DOC

Ο ημερήσιος βαθμός απομάκρυνσης DR υπολογίζεται σύμφωνα με το σημείο 1.2.1.

Υπολογίζεται ο μέσος όρος της σειράς των τιμών DR καθώς και η τυπική απόκλιση σύμφωνα με την εξίσωση [6]

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \qquad [6]$$

όπου:

S_{DR} = τυπική απόκλιση της σειράς των τιμών DR_i,

$\overline{DR}$ = μέση τιμή του DR_i,

n = αριθμός προσδιορισμών.

Οι ακραίες τιμές της σειράς DR απαλείφονται σύμφωνα με κατάλληλη στατιστική μέθοδο, π.χ. Nalimov [6], στη στάθμη πιθανότητας 95 % και υπολογίζονται πάλι ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων για το DR.

Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με την εξίσωση [7] ως:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR} \qquad [7]$$

όπου:

$t_{n-1};\alpha$ = τιμή πίνακα του t για n ζεύγη τιμών E και E_0 και στατιστική εμπιστοσύνη P (P = 1 − α), όπου P έχει οριστεί σε 95 % (1).

Το αποτέλεσμα αναφέρεται ως ο μέσος όρος με όρια ανοχής στη στάθμη εμπιστοσύνης 95 %, η αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ο αριθμός των δεδομένων της απαλλαγμένης από τις ακραίες τιμές σειράς δεδομένων DR και ο αριθμός των ακραίων τιμών, π.χ.:

DR = (98,6 ± 2,3) % απομάκρυνση DOC,

S = 4,65 % απομάκρυνση DOC

n = 18,

x = αριθμός ακραίων τιμών.

2.2.2. *Χρησιμοποίηση ειδικής ανάλυσης*

Το ποσοστό απομάκρυνσης της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση (R_w) υπολογίζεται σύμφωνα με το 1.2.2.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

— το έντυπο φύλλο που περιέχεται στο προσάρτημα 3 και δείχνει τις συνθήκες λειτουργίας για τη δοκιμασία,

— τον εξοπλισμό που επιλέχθηκε (δοκιμή επικύρωσης ΟΟΣΑ ή πορώδες δοχείο),

— τον τρόπο λειτουργίας που επιλέχθηκε: μέθοδος συζευγμένων μονάδων ή όχι,

— τα λύματα: συνθετικά ή οικιακά και, σε περίπτωση οικιακών λυμάτων, την ημερομηνία και τοποθεσία συλλογής,

— το εμβόλιο με την ημερομηνία και τοποθεσία δειγματοληψίας,

— δήλωση όπου περιγράφεται η αναλυτική μέθοδος, όταν διεξάγονται ειδικές αναλύσεις,

— γραφική παράσταση της απομάκρυνσης του DOC ή COD σε συνάρτηση με το χρόνο, τόσο για την περίοδο κανονικής λειτουργίας όσο και για την περίοδο αξιολόγησης,

— την αναλυτική ανάκτηση της ελεγχόμενης ουσίας σαν COD ή DOC στο μητρικό διάλυμα,

— αν έχουν γίνει ειδικές αναλύσεις, γραφική παράσταση του ποσοστού απομάκρυνσης της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση σε συνάρτηση με το χρόνο (περίοδοι εισροής και αξιολόγησης),

— τη μέση απομάκρυνση του COD ή DOC ή της ελεγχόμενης ουσίας και την τυπική απόκλιση, όπως υπολογίζονται από τα αποτελέσματα της περιόδου αξιολόγησης, δηλαδή όταν παρουσιάζεται σταθερή απομάκρυνση του υλικού ελέγχου ή της περιόδου σταθερής λειτουργίας,

— γραφική παράσταση της συγκέντρωσης ενεργού ιλύος σε συνάρτηση με το χρόνο,

— οποιαδήποτε παρατήρηση σχετικά με την ενεργό ιλύ (απόρριψη περισσευούμενης ιλύος, συσσώρευση, $FeCl_3$ κλπ.),

— τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε,

— οποιαδήποτε αποτελέσματα από αναλύσεις της ιλύος,

— όλες τις πληροφορίες και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την ελεγχόμενη ουσία και την ουσία αναφοράς, αν χρησιμοποιήθηκε,

— επιστημονική αιτιολόγηση οποιωνδήποτε αλλαγών στη διαδικασία.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η μικρή απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από την υδατική φάση μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των μικροοργανισμών από την ουσία. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί επίσης να δειχθεί από λύση και απώλεια ιλύος, με συνέπεια θολό υπερκείμενο, και με ελάττωση της αποτελεσματικότητας της μονάδας πιλότου (ή προσομοίωσης) ως προς την απομάκρυνση του DOC (ή COD).

Συχνά παίζει ρόλο και η φυσικο-χημική προσρόφηση. Οι διαφορές μεταξύ της βιολογικής δράσης στο μόριο και της φυσικοχημικής προσρόφησης μπορούν να δειχθούν με ανάλυση της ιλύος μετά από ικανοποιητική αποβολή του προσροφημένου υλικού.

Απαιτούνται συμπληρωματικές δοκιμασίες αν πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης (ή μερικής βιοαποικοδόμησης) και προσρόφησης. Η διάκριση μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους, αλλά ο πιο πειστικός είναι να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο σαν ενοφθάλμισμα σε μια δοκιμασία ρύθμισης βάσης (κατά προτίμηση δοκιμασία αναπνοομετρίας).

Αν παρατηρηθεί μεγάλη απομάκρυνση του DOC ή COD, αυτό οφείλεται σε βιοαποικοδόμηση, ενώ σε μικρή απομάκρυνση δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ βιοαποικοδόμησης και εξάλειψης. Για παράδειγμα, αν μια διαλυτή ένωση έχει υψηλή σταθερά προσρόφησης, της τάξης του 98%, και η ταχύτητα απώλειας της περισσευούμενης ιλύος είναι 10% την ημέρα, μπορεί να παρουσιαστεί απομάκρυνση μέχρι 40%. Με ταχύτητα διαρροής της περισσευούμενης ιλύος 30%, η απομάκρυνση που οφείλεται σε προσρόφηση στην περίσσεια της ιλύος και εξάλειψη μαζί με αυτή μπορεί να φθάσει μέχρι 65% (4).

Όταν διεξάγεται ειδική ανάλυση θα πρέπει να δίνεται προσοχή στη σχέση ανάμεσα στη δομή της ουσίας και στην ειδική ανάλυση που γίνεται. Στην περίπτωση αυτή, το φαινόμενο που παρατηρείται δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μετατροπή της ουσίας σε ανόργανη.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 303 A*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

(2) Παράρτημα V Γ9 Degradation Test — Chemical Oxygen Demand, οδηγία 84/449/ΕΟΚ της Επιτροπής, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 251 της 19. 9. 1984.

(3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, U.K.

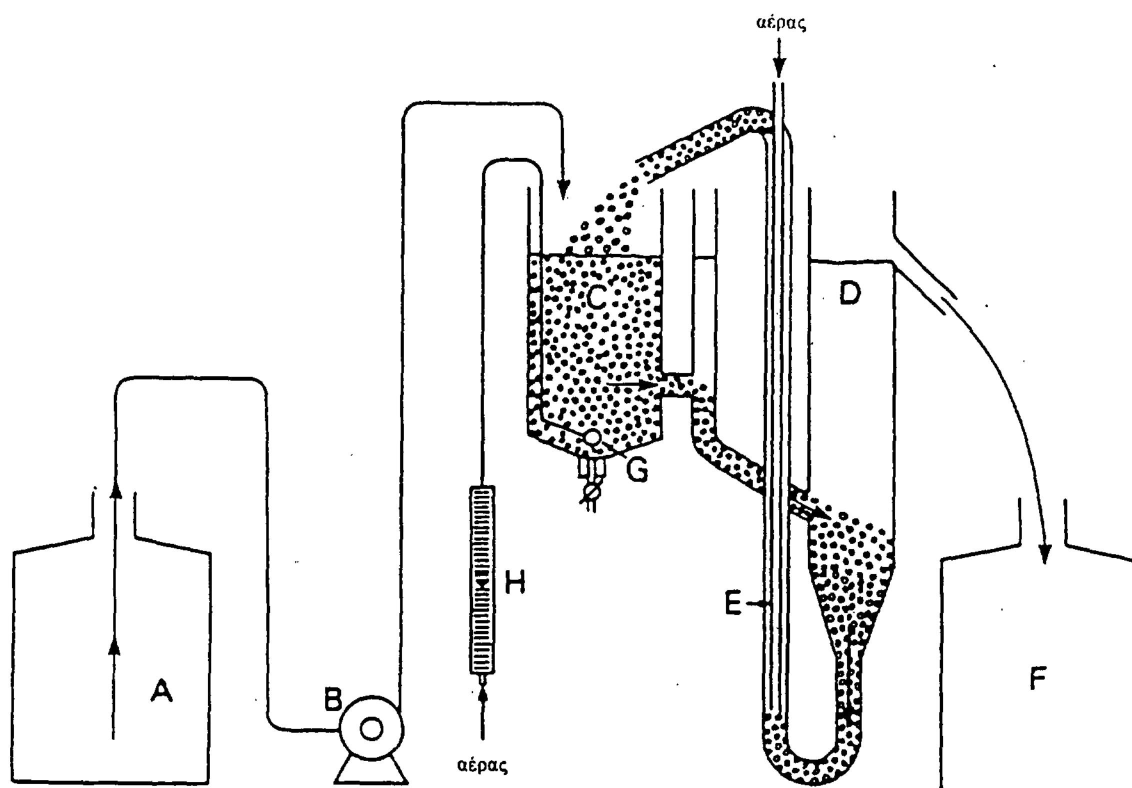
(4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161-171.

(5) Οδηγίες 82/242/ΕΟΚ και 82/243/ΕΟΚ του Συμβουλίου, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 109 της 22. 4. 1982, για την τροποποίηση των οδηγιών 73/404/ΕΟΚ και 73/405/ΕΟΚ για την βιοαποικοδόμηση των απορρυπαντικών, *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων* αριθ. L 347 της 17. 12. 1973.

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius — Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), pp. 406-408.

Προσάρτημα 1

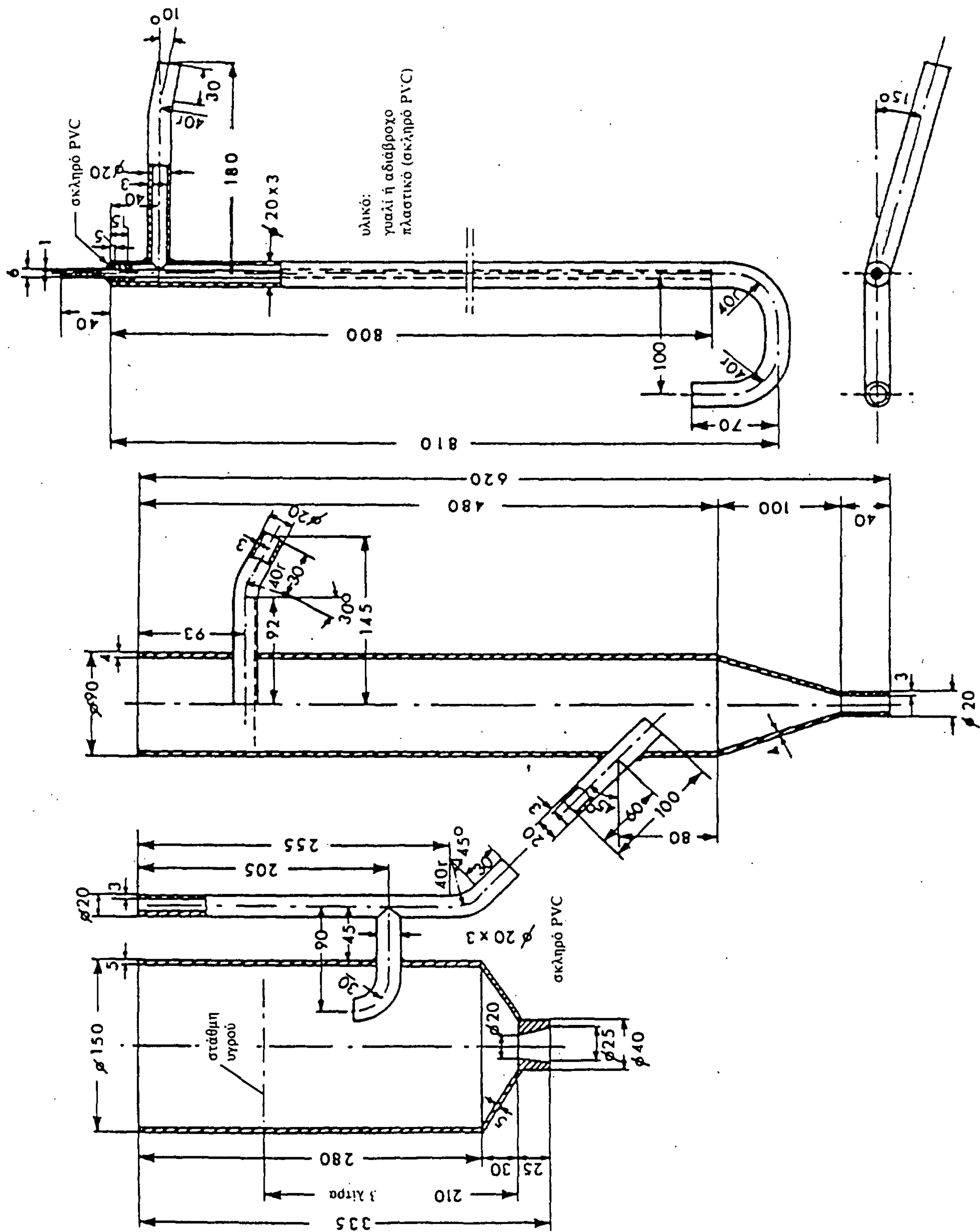
Σχήμα 1



Κλείδα:

A = Δοχείο αποθήκευσης
B = Δοσιμετρική αντλία
C = Θάλαμος αερισμού (χωρητικότητας 3 l)
D = Δοχείο καθίζησης
E = Πεπιεσμένος αέρας
F = Συλλέκτης
G = Ανεμιστήρας
H = Μετρητής ροής του αέρα (προαιρετικός).

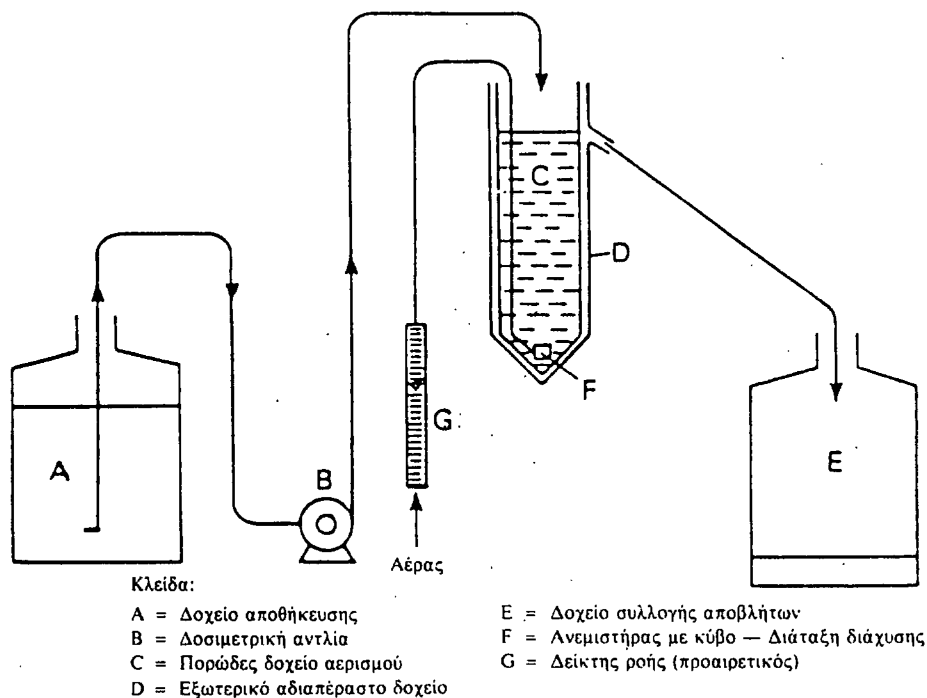
Σχήμα 2


σκληρό PVC
υλικό:
γυαλί ή αδιάβροχο
πλαστικό (σκληρό PVC)
ø20 x 3
800
810
620
480
σκληρό PVC
στάθμη
υγρού
1 λίτρο
280
335
210

Προσάρτημα 2

Σχήμα 1

Εξοπλισμός για τον υπολογισμό της βιοαποικοδομητικότητας

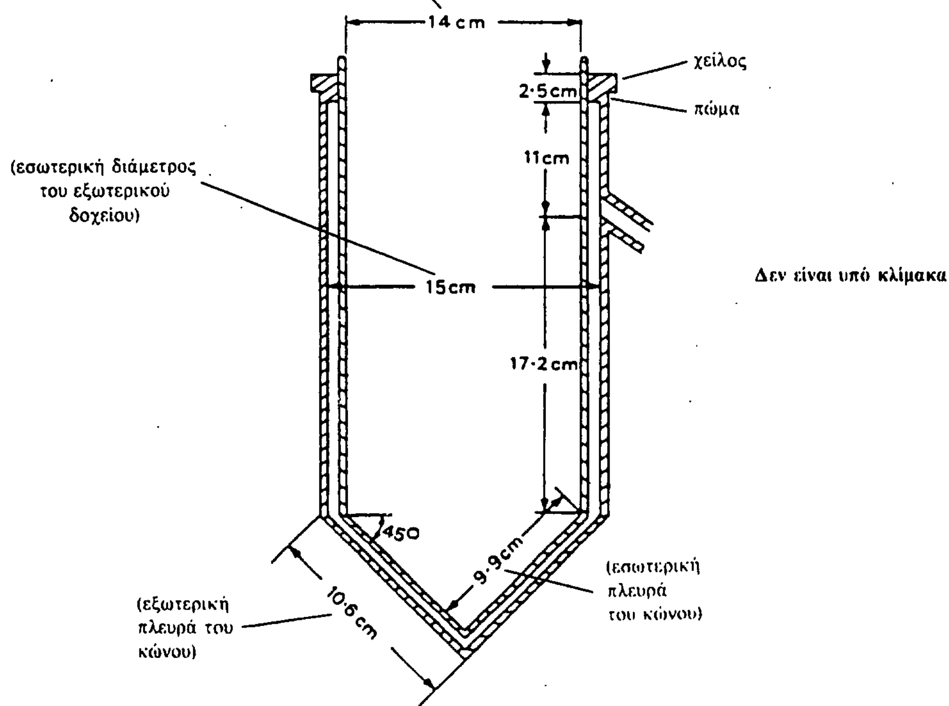


Κλείδα:

A = Δοχείο αποθήκευσης
B = Δοσιμετρική αντλία
C = Πορώδες δοχείο αερισμού
D = Εξωτερικό αδιαπέραστο δοχείο
E = Δοχείο συλλογής αποβλήτων
F = Ανεμιστήρας με κύβο — Διάταξη διάχυσης
G = Δείκτης ροής (προαιρετικός)

Σχήμα 2

Λεπτομέρειες του πορώδους δοχείου αερισμού των 3 l



Προσάρτημα 3

Συνθήκες λειτουργίας για τη δοκιμασία προσομοίωσης ενεργοποιημένης ιλύος

Σημειώστε στην κάθε ομάδα

Συσκευή

Δοκιμή επικύρωσης ΟΟΣΑ ☐
Πορώδες δοχείο ☐

Τρόπος λειτουργίας

Μονή μονάδα ☐
Συζευγμένες μονάδες ☐
Μη συζευγμένες μονάδες ☐

Διενοφθαλμισμός

Ουδείς ☐
Ενεργοποιημένη ιλύς ☐
Υπερκείμενο ☐

Χρόνος κατακράτησης

3 ώρες ☐
6 ώρες ☐

Βασικό υλικό δοκιμασίας

Οικιακά λύματα ☐
Συνθετικά λύματα ☐

Εμβόλιο

Δευτερογενή απόβλητα ☐
Σύνθετο ☐
Ενεργοποιημένη ιλύς ☐

Πρόσθεση υλικού δοκιμασίας

Από την αρχή ☐
Προοδευτική αύξηση ☐
Αφού η ιλύς έχει σχηματισθεί ☐

Ανάλυση

Ειδική ☐
COD ☐
DOC ☐

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Με τη μέθοδο που περιγράφεται εκτιμάται η επίδραση μιας ελεγχόμενης ουσίας στους μικροοργανισμούς με μέτρηση της ταχύτητας αναπνοής σε καθορισμένες συνθήκες, με την παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας.

Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι να προσφέρει ταχεία μέθοδο εξέτασης με την οποία να είναι δυνατόν να αναγνωριστούν ουσίες που μπορεί να έχουν βλαπτική δράση σε εγκαταστάσεις αερόβιου μικροβιακού καθαρισμού και να προσδιοριστούν κατάλληλες μη ανασταλτικές συγκεντρώσεις των ελεγχόμενων ουσιών για να χρησιμοποιηθούν σε ελέγχους βιοαποικοδομησιμότητας.

Του οριστικού ελέγχου είναι δυνατόν να προηγηθεί δοκιμή προσδιορισμού περιοχής τιμών, η οποία παρέχει πληροφορίες για το εύρος των συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον καθαυτό έλεγχο.

Το πρωτόκολλο του ελέγχου περιλαμβάνει δύο μάρτυρες χωρίς την ελεγχόμενη ουσία, έναν αρχή και έναν στο τέλος της διαδικασίας ελέγχου. Θα πρέπει επίσης να ελέγχεται κάθε παρτίδα ενεργοποιημένης ιλύος με τη βοήθεια ουσίας αναφοράς.

Η μέθοδος αυτή ισχύει κατ' εξοχήν για ουσίες που είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό εξαιτίας της διαλυτότητάς τους στο νερό και της χαμηλής πτητικότητάς τους.

Για ουσίες με περιορισμένη διαλυτότητα στα υλικά ελέγχου, ίσως να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η EC_{50}.

Τα αποτελέσματα που βασίζονται στην πρόσληψη οξυγόνου μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα όταν η ελεγχόμενη ουσία έχει την τάση να δρα σαν παράγοντας αποσύζευξης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Για τη διεξαγωγή του ελέγχου είναι χρήσιμα τα ακόλουθα στοιχεία:

— διαλυτότητα στο νερό,

— τάση ατμών

— συντακτικός τύπος,

— καθαρότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

Σύσταση

Η ενεργοποιημένη ιλύς μπορεί να περιέχει ισχυρούς παθογόνους οργανισμούς και πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Ταχύτητα αναπνοής είναι η κατανάλωση του οξυγόνου των λυμάτων ή των μικροοργανισμών από την αερόβια ιλύ επεξεργασίας και εκφράζεται γενικά σε mg O_2 ανά mg ιλύος ανά ώρα.

Για να υπολογιστεί η ανασταλτική δράση μιας ελεγχόμενης ουσίας σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, η ταχύτητα αναπνοής εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου των ταχυτήτων αναπνοής των δύο μαρτύρων:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{τοις εκατό αναστολή}$$

όπου:

R_s = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου στη συγκέντρωση ελέγχου της ελεγχόμενης ουσίας,

RC_1 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου, μάρτυρας C_1,

RC_2 = ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου, μάρτυρας C_2.

EC_{50} στη μέθοδο αυτή είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στην οποία η ταχύτητα αναπνοής είναι 50 % της ταχύτητας που δείχνουν οι μάρτυρες, στις συνθήκες που καθορίζονται στη μέθοδο.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Συνιστάται η χρησιμοποίηση της 3,5-διχλωροφαινόλης, γνωστού αναστολέα της αναπνοής, σαν ουσίας αναφοράς και ο έλεγχος της ουσίας αυτής για EC_{50} σε κάθε παρτίδα ενεργού ιλύος ως μέσο πιστοποίησης ότι η ευαισθησία της ιλύος είναι κανονική.

1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Μετριέται η ταχύτητα αναπνοής ενεργού ιλύος, που τροφοδοτείται με πρότυπη ποσότητα θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα, μετά από περίοδο επαφής 30 λεπτών ή τριών ωρών, ή και τα δύο. Μετριέται επίσης η ταχύτητα αναπνοής της ίδιας ενεργού ιλύος παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της δοκιμαζόμενης ουσίας σε συνθήκες κατά τα άλλα όμοιες. Η ανασταλτική δράση της δοκιμαζόμενης ουσίας σε συγκεκριμένη συγκέντρωση εκφράζεται σαν επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου των ταχυτήτων αναπνοής των δύο μαρτύρων. Η τιμή της EC_{50} υπολογίζεται από προσδιορισμούς σε διάφορες συγκεντρώσεις.

1.5. **Ποιοτικά κριτήρια**

Τα αποτελέσματα του ελέγχου είναι έγκυρα εφόσον:

— οι ταχύτητες αναπνοής στους δύο μάρτυρες απέχουν μεταξύ τους κατά 15 %,

— η EC_{50} (30 λεπτά ή/και 3 ώρες) της 3,5-διχλωροφαινόλης κυμαίνεται μεταξύ των παραδεκτών ορίων 5 και 30 mg/l.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας

Παρασκευάζονται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας στην αρχή της μελέτης με τη βοήθεια μητρικού διαλύματος. Όταν ακολουθείται η διαδικασία που συνιστάται παρακάτω, κατάλληλη είναι μια συγκέντρωση μητρικού διαλύματος 0,5 g/l.

1.6.1.2. Διάλυμα της ουσίας αναφοράς

Μπορεί λόγου χάριν να παρασκευαστεί διάλυμα 3,5-διχλωροφαινόλης με διάλυση 0,5 g 3,5-διχλωροφαινόλης σε 10 ml NaOH 1M, αραίωση έως τα 30 ml περίπου με απεσταγμένο νερό, προσθήκη H_2SO_4 0,5 M υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστεί ίζημα —θα απαιτηθούν περίπου 8 ml H_2SO_4 0,5 M— και τέλος αραίωση του μείγματος έως το ένα λίτρο με απεσταγμένο νερό. Το pH θα πρέπει τότε να κυμαίνεται μεταξύ 7 και 8.

1.6.1.3. Συνθετικά απόβλητα

Παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα με διάλυση των ακολούθων ποσοτήτων ουσιών σε ένα λίτρο νερού:

— 16 g πεπτόνης,
— 11 g εκχυλίσματος,
— 3 g ουρίας.
— 0,7 g NaCl,
— 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
— 0,2 g $CaCl_2 \cdot 7H_2O$,
— 2,8 g K_2HPO_4

Σημείωση 1: Τα συνθετικά αυτά απόβλητα είναι εκατό φορές πυκνότερα από αυτά που περιγράφονται στην τεχνική έκθεση του ΟΟΣΑ «Προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδομησιμότητας των τασιενεργών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα συνθετικά απορρυπαντικά» (11 Ιουνίου 1976), με την προσθήκη οξίνου φωσφορικού καλίου.

Σημείωση 2: Στην περίπτωση που το παρασκευασθέν υλικό δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 0 έως 4 °C, για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μιας εβδομάδας, υπό συνθήκες που δεν προκαλούν οποιαδήποτε μεταβολή στη σύνθεσή του.

Το υλικό μπορεί επίσης να αποστειρωθεί πριν από τη φύλαξή του, ή μπορεί να γίνει η προσθήκη της πεπτόνης και του εκχυλίσματος κρέατος αμέσως πριν τη διεξαγωγή της δοκιμασίας. Πριν τη χρήση γίνεται πλήρης ανάμειξη και ρυθμίζεται το pH.

1.6.2. *Συσκευές και όργανα*

Συσκευή μέτρησης: Το ακριβές σχήμα δεν έχει μεγάλη σημασία. Πάντως, δεν πρέπει να υπάρχει υπερκείμενη αέρια φάση και το ηλεκτρόδιο θα πρέπει να εφαρμόζει στεγανά στο λαιμό της φιάλης μετρήσεως.

Απαιτείται συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός, και κυρίως τα εξής:

— συσκευή μέτρησης,

— διάταξη αερισμού,

— ηλεκτρόδιο και όργανο μέτρησης του pH,

— ηλεκτρόδιο οξυγόνου.

1.6.3. *Παρασκευή του ενοφθαλμίσματος*

Ως μικροβιακό ενοφθάλμισμα για τον έλεγχο χρησιμοποιείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας αστικών κυρίως αποβλήτων.

Αφού φθάσει στο εργαστήριο η ιλύς, τα χοντρά σωματίδια μπορούν, αν χρειάζεται, να απομακρυνθούν, αφήνοντας το σύστημα σε ηρεμία για λίγο, παραδείγματος χάριν επί 15 λεπτά, και αποχύνεται η υπερκείμενη στιβάδα που αποτελείται από λεπτότερα σωματίδια, προς χρήση. Εναλλακτικά, η ιλύς μπορεί να αναμειχθεί με τη χρήση αναμεικτήρα για διάστημα μερικών δευτερολέπτων.

Εάν επιπλέον πιστεύεται ότι υπάρχει ανασταλτικό υλικό, η ιλύς πρέπει να πληθεί με νερό της βρύσης ή με ένα ισοτονικό διάλυμα. Μετά τη φυγοκέντρηση, αποχύνεται η υπερκείμενη στιβάδα (η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές).

Μικρή ποσότητα της ιλύος ζυγίζεται και ξηραίνεται. Από το αποτέλεσμα αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα υγρής ιλύος που πρέπει να εναιωρηθεί σε νερό προκειμένου να ληφθεί ενεργοποιημένη ιλύς που θα περιέχει αιωρούμενα στερεά αναμεγμένα με υγρό σε ποσότητα μεταξύ 2 και 4 g/l. Το επίπεδο αυτό συνεπάγεται συγκέντρωση στο υλικό ελέγχου 0,8 έως 1,6 g/l, εφόσον ακολουθηθεί η παρακάτω συνιστώμενη διαδικασία.

Αν δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η ιλύς την ημέρα της συλλογής της, προστίθενται 50 ml συνθετικών αποβλήτων για κάθε λίτρο ενεργοποιημένης ιλύος που έχει παρασκευαστεί όπως προαναφέρθηκε. Το μείγμα αερίζεται όλη τη νύκτα στους 20 ± 2 °C. Στη συνέχεια διατηρείται υπό αερισμό για να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ημέρας. Πριν χρησιμοποιηθεί ελέγχεται το pH του και ρυθμίζεται, αν χρειάζεται, μεταξύ 6,0 και 8,0. Τα αιωρούμενα στερεά του αναμειγμένου υγρού προσδιορίζονται όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο.

Αν η ίδια παρτίδα ιλύος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί τις επόμενες ημέρες (μέγιστο όριο τέσσερις ημέρες), στο τέλος κάθε εργάσιμης ημέρας προστίθενται ακόμα 50 ml θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα.

1.6.4. *Διεξαγωγή της δοκιμασίας*

Διάρκεια/περίοδος επαφής:	30 λεπτά ή/και τρείς ώρες, στη διάρκεια των οποίων γίνεται αερισμός
Νερό:	Πόσιμο νερό (αποχλωριωμένο αν χρειάζεται)
Παροχή αέρα:	Καθαρός αέρας απαλλαγμένος από έλαια. Ρεύμα αέρα 0,5 έως 1 λίτρο/λεπτό.
Συσκευή μέτρησης:	Φιάλη με επίπεδο πυθμένα όπως π.χ. φιάλη BOD
Μετρητής οξυγόνους:	Κατάλληλο ηλεκτρόδιο οξυγόνου με καταγραφέα
Θρεπτικό διάλυμα:	Συνθετικά απόβλητα (βλέπε παραπάνω)
Ελεγχόμενη ουσία:	Παρασκευάζεται πρόσφατο διάλυμα ελέγχου στην αρχή της δοκιμασίας
Ουσία αναφοράς:	Π.χ. 3,5 — διχλωροφαινόλη (τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις)
Μάρτυρες:	Ενοφθαλμισμένο δείγμα χωρίς ελεγχόμενη ουσία
Θερμοκρασία:	20 ± 2 °C

Στη συνέχεια περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που πρέπει να ακολουθείται τόσο για την ουσία αναφοράς όσο και για την ελεγχόμενη ουσία για την περίοδο επαφής των τριών ωρών:

Χρησιμοποιούνται πολλά δοχεία (π.χ. ποτήρια ζέσεως του 1 λίτρου).
Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις που να διαφέρουν μεταξύ τους κατά σταθερό συντελεστή, κατά προτίμηση όχι μεγαλύτερο από 3,2.

Στο χρόνο «0», 16 ml θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα αραιώνονται έως τα 300 ml με νερό. Προστίθενται 200 ml μικροβιακού ενοφθαλμίσματος και το ολικό μείγμα (500 ml) φέρεται στο πρώτο δοχείο (πρώτος μάρτυρας C_1).

Τα δοχεία του ελέγχου πρέπει να αερίζονται συνεχώς, ώστε το επίπεδο του διαλυμένου O_2 να μην κατέρχεται κάτω των 2,5 mg/l και ώστε η συγκέντρωση του O_2, αμέσως πριν τη μέτρηση της ταχύτητας αναπνοής, να κυμαίνεται γύρω στα 6,5 mg/l.

Στο χρόνο «15 min» (τα 15 λεπτά είναι αυθαίρετο αλλά κατάλληλο χρονικό διάστημα) επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία, με τη διαφορά ότι προστίθενται 100 ml από το μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας στα 16 ml συνθετικών αποβλήτων πριν από την προσθήκη νερού έως τα 300 ml και μικροβιακού εκχυλίσματος μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Το μείγμα αυτό φέρεται σε δεύτερο δοχείο και αερίζεται όπως προαναφέρθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κατά διαστήματα των 15 λεπτών με διάφορους όγκους μητρικού διαλύματος της ελεγχόμενης ουσίας ώστε να ληφθεί σειρά δοχείων με διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Τέλος, παρασκευάζεται δεύτερος μάρτυρας (C_2).

Μετά τρεις ώρες μετρείται το pH, και ένα καλά αναμειγμένο δείγμα του περιεχομένου του πρώτου δοχείου μεταγγίζεται στη συσκευή μέτρησης και μετριέται η ταχύτητα αναπνοής για περίοδο 10 λεπτών το πολύ.

Ο προσδιορισμός αυτός επαναλαμβάνεται με το περιεχόμενο κάθε δοχείου ανά 15 λεπτά, έτσι ώστε η περίοδος επαφής να είναι τρεις ώρες για κάθε δοχείο.

Με τον ίδιο τρόπο ελέγχεται η ουσία αναφοράς σε κάθε παρτίδα μικροβιακού ενοφθαλμιάσματος.

Θα χρειασθεί διαφορετικό σύστημα (π.χ. περισσότεροι μετρητές οξυγόνου) αν πρόκειται να διεξαχθούν μετρήσεις μετά περίοδο επαφής 30 λεπτών.

Αν απαιτείται μέτρηση της χημικής κατανάλωσης οξυγόνου, ετοιμάζονται πρόσθετα δοχεία που περιέχουν ελεγχόμενη ουσία, θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα και νερό όχι όμως ενεργοποιημένη ιλύ. Η κατανάλωση οξυγόνου μετριέται και σημειώνεται μετά από περίοδο αερισμού 20 λεπτών ή/και τριών ωρών (περίοδος επαφής).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η ταχύτητα αναπνοής υπολογίζεται από το σήμα του καταγραφέα σε mg O_2 ανά λίτρο και ανά ώρα στην περιοχή μεταξύ 6,5 mg O_2/l και 2,5 mg O_2/l περίπου ή για περίοδο 10 λεπτών όταν η ταχύτητα αναπνοής είναι χαμηλή. Το τμήμα της καμπύλης αναπνοής με βάση το οποίο μετριέται η ταχύτητα αναπνοής θα πρέπει να είναι ευθύγραμμο.

Αν οι ταχύτητες αναπνοής των δύο μαρτύρων απέχουν μεταξύ τους περισσότερο από 15 % ή αν η EC_{50} (30 λεπτά ή/και τρεις ώρες) της ουσίας αναφοράς δεν κυμαίνεται μεταξύ των παραδεκτών ορίων (5 και 30 mg/l για την 3,5-διχλωροφαινόνη), ο έλεγχος είναι άκυρος και πρέπει να επαναληφθεί.

Η επί τοις εκατό αναστολή υπολογίζεται σε κάθε συγκέντρωση ελέγχου (βλέπε σημείο 1.2). Η επί τοις εκατό αναστολή παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, σε ημιλογαριθμικό χαρτί (ή ημιλογαριθμικό χαρτί πιθανότητας). Λαμβάνεται η τιμή EC_{50}.

Είναι δυνατόν να προσδιοριστούν όρια εμπιστοσύνης 95 % για τις τιμές EC_{50} με η βοήθεια πρότυπων μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

- Ελεγχόμενη ουσία: δεδομένα χημικής ταυτοποίησης.
- Σύστημα ελέγχου: πηγή, συγκέντρωση και οποιαδήποτε προκατεργασία της ενεργοποιημένης ιλύος.
- Συνθήκες ελέγχου:
  - pH του μείγματος της αντίδρασης πριν τη μέτρηση της αναπνοής,
  - θερμοκρασία ελέγχου,
  - διάρκεια του ελέγχου,
  - ουσία αναφοράς και την EC_{50} που μετρήθηκε γι' αυτήν,
  - αβιοτική πρόσληψη οξυγόνου (αν διαπιστώθηκε).
- Αποτελέσματα:
  - όλα τα αποτελέσματα των μετρήσεων,
  - καμπύλη αναστολής και μέθοδο υπολογισμού της EC_{50}
  - EC_{50} και, αν είναι δυνατόν, στάθμη εμπιστοσύνης 95 %, EC_{20} και EC_{80},
  - όλες οι παρατηρήσεις και οποιαδήποτε παρέκκλιση από την παρούσα μέθοδο ελέγχου που θα μπορούσε να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η τιμή EC_{50} θα πρέπει να θεωρείται απλός δείκτης της πιθανής τοξικότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας είτε για την ενεργοποιημένη ιλύ κατεργασίας αποβλήτων είτε για τους μικροοργανισμούς των λυμάτων, δεδομένου ότι δεν είναι δυνατόν σ' ένα εργαστηριακό έλεγχο, να επιτευχθεί ακριβής προσομοίωση των σύνθετων αλληλεπιδράσεων που σημειώνονται στο περιβάλλον. Επιπλέον, δοκιμαζόμενες ουσίες που μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση στην οξείδωση της αμμωνίας μπορούν να σχηματίσουν άτυπες καμπύλες αναστολής. Επομένως η ερμηνεία των καμπυλών αυτών πρέπει να γίνεται προσεκτικά.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) Διεθνές πρότυπο ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, σ. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, σ. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Μέθοδος που συνιστάται αριθ. 103*, η οποία περιγράφεται επίσης από τούς:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, σ. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung*, 6, 1977, σ. 249.

(7) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1981, *Test Guideline 209*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ SCAS

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Σκοπός της μεθόδου είναι η αξιολόγηση της ενδεχόμενης τελικής βιοαποικοδομησιμότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ουσιών, όταν εκτίθενται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών εξασφαλίζεται με την καθημερινή προσθήκη διαυγασμένων λυμάτων ως υλικού τροφοδοσίας. (Για τις απαιτήσεις του Σαββατοκύριακου, τα λύματα μπορούν να φυλαχθούν στους 4 °C. Εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση των συνθετικών λυμάτων της δοκιμασίας επιβεβαίωσης του ΟΟΣΑ.)

Είναι δυνατόν να σημειωθεί φυσικοχημική προσρόφηση των αιωρούμενων στερεών υλών, πράγμα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (βλέπε σημείο 3.2).

Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου κατακράτησης της υγρής φάσης (36 ώρες) και της διακεκομμένης προσθήκης θρεπτικών υλικών, η δοκιμή δεν αποτελεί προσομοίωση των συνθηκών που απαντούν σε μια εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με διάφορες ελεγχόμενες ουσίες δείχνουν ότι η δοκιμή διαθέτει υψηλό δυναμικό βιοαποικοδόμησης.

Οι συνθήκες που παρέχονται από τη δοκιμή είναι πολύ ευνοϊκές για την επιλογή ή/και την προσαρμογή μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομήσουν την ελεγχόμενη ένωση. (Η δοκιμή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή εγκλιματισμένων ενοφθαλμισμάτων για χρήση σε άλλες δοκιμές.)

Στη μέθοδο αυτή, η μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της τελικής βιοαποικοδομησιμότητας των ελεγχομένων ουσιών. Είναι προτιμότερο να προσδιορίζεται η τιμή DOC μετά από οξίνιση και καθαρισμό παρά σαν διαφορά μεταξύ $C_{ολικό}$ — $C_{ανόργανο}$.

Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου μπορεί να επιτρέψει να εκτιμηθεί η αρχική αποικοδόμηση της ουσίας (εξαφάνιση της μητρικής χημικής σύνταξης).

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο στις ελεγχόμενες οργανικές ουσίες, οι οποίες, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στη δοκιμή:

— είναι διαλυτές στο νερό (τουλάχιστον 200 mg διαλυμένου οργανικού άνθρακα/l),

— έχουν αμελητέα τάση ατμών,

— δεν ασκούν ανασταλτική δράση στα βακτηρίδια,

— δεν προσροφώνται σημαντικά μέσα στο σύστημα ελέγχου,

— δεν παρουσιάζουν απώλειες μέσω αφρισμού από το διάλυμα ελέγχου.

Η περιεκτικότητα του ελεγχόμενου υλικού σε οργανικό άνθρακα πρέπει να είναι καθορισμένη.

Τα στοιχεία για τις σχετικές αναλογίες των κυριότερων συστατικών του ελεγχόμενου υλικού είναι χρήσιμο για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις χαμηλών ή οριακών αποτελεσμάτων.

Τα στοιχεία για την τοξικότητα της ουσίας απέναντι στους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι χρήσιμα για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και την επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης για τη δοκιμή.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

C_T = συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, εκφρασμένη σε οργανικό άνθρακα, όπως απαντά ή προστίθεται στα διαυγασμένα λύματα στην αρχή της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_t = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό της μονάδας ελέγχου στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l),

C_c = συγκέντρωση διαλυμένου οργανικού άνθρακα που βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό του μάρτυρα στο τέλος της περιόδου αερισμού (mg/l).

Στη μέθοδο αυτή, η βιοαποικοδόμηση ορίζεται ως η εξαφάνιση του οργανικού άνθρακα και μπορεί να εκφράζεται ως:

1. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκρυνσης D_{da} του ποσού της ουσίας που προστίθεται καθημερινά:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

όπου:

D_{da} = αποικοδόμηση/καθημερινή προσθήκη·

2. το επί τοις εκατό ποσοστό απομάκουνσης D_{ssd} του ποσού της ουσίας που υπάρχει στην αρχή κάθε ημέρας:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(\alpha)]$$

$$= \frac{2C_T - 2C\,(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(\beta)]$$

όπου:

D_{ssd} = αποικοδόμηση/ουσία στην αρχή της ημέρας·

οι δείκτες i και (i + 1) αναφέρονται στην ημέρα της μέτρησης.

Η εξίσωση 2(α) συνιστάται στην περίπτωση που η τιμή DOC των αποβλήτων μεταβάλλεται από ημέρα σε ημέρα, ενώ η εξίσωση 2(β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η τιμή DOC των αποβλήτων παραμένει σχετικά σταθερή από ημέρα σε ημέρα.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν μελετάται μια νέα ουσία, μπορεί να είναι χρήσιμες οι ουσίες αναφοράς παρ' όλα αυτά δεν συνιστάται στο παρόν έγγραφο καμιά ειδική ουσία αναφοράς.

Παρέχονται δεδομένα για πολλές ενώσεις που έχουν αξιολογηθεί με κυκλικές δοκιμές (βλέπε προσάρτημα 1), κυρίως για να μπορεί να γίνεται βαθμονόμηση της μεθόδου από καιρό σε καιρό και προκειμένου να επιτραπεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων όταν χρησιμοποιείται άλλη μέθοδος.

1.4. **Αρχή της μεθόδου ελέγχου**

Σε μονάδα ενεργοποιημένης ιλύος ημισυνεχούς λειτουργίας (SCAS) τοποθετείται ενεργοποιημένη ιλύς από εγκατάσταση κατεργασίας λυμάτων. Προτίθενται η ελεγχόμενη ουσία και οικιακά λύματα που έχουν υποστεί καθίζηση και το μείγμα αερίζεται για 23 ώρες. Στη συνέχεια παύει ο αερισμός, η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται.

Η ιλύς που παραμένει στο θάλαμο αερισμού αναμειγνύεται κατόπιν με νέο κλάσμα ελεγχόμενης ουσίας και λυμάτων και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

Η βιοαποικοδόμηση υπολογίζεται με προσδιορισμό της περιεκτικότητας του υπερκείμενου υγρού σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα. Η τιμή αυτή συγκρίνεται με την τιμή που βρίσκεται για το υγρό που λαμβάνεται από ένα σωλήνα μάρτυρα, στον οποίο έχουν προστεθεί μόνο διαυγασμένα λύματα.

Όταν χρησιμοποιείται ειδική αναλυτική μέθοδος, μπορούν να μετρηθούν οι μεταβολές στη συγκέντρωση του μητρικού μορίου που οφείλεται στη βιοαποικοδόμηση (αρχική βιοαποικοδομησιμότητα).

1.5. **Ποιοτικά κριτήρια**

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου αυτής, που βασίζεται στην απομάκρυνση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. (Όταν εξετάζεται η αρχική βιοαποικοδόμηση, λαμβάνονται δεδομένα μεγάλης ακρίβειας για υλικό που βιοαποικοδομείται σε μεγάλο βαθμό.)

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις του τυφλού και, σε μικρότερη έκταση, από την ακρίβεια στον προσδιορισμό του διαλυμένου οργανικού άνθρακα καθώς και από τα επίπεδα της ελεγχόμενης ένωσης στο υγρό στην αρχή κάθε κύκλου.

1.6. **Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας**

1.6.1. *Προετοιμασία*

Συναρμολογείται επαρκής αριθμός καθαρών μονάδων αερισμού (εναλλακτική δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση της πρωτότυπης μονάδας ελέγχου SCAS των 1,5 l) και σωλήνων εισαγωγής του αέρα (σχήμα 1) για κάθε ελεγχόμενη ουσία και για τους μάρτυρες. Ο συμπιεσμένος αέρας, που διοχετεύεται στις μονάδες ελέγχου, αφού καθαρισθεί με τη βοήθεια ηθμού από φαρμακευτικό βαμβάκι, πρέπει να είναι απαλλαγμένος από οργανικό άνθρακα και να έχει προηγουμένως κορεσθεί με νερό ώστε να ελαττωθούν οι απώλειες που οφείλονται σε εξάτμιση.

Από εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιδύος, που επεξεργάζεται κυρίως αστικά λύματα, λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού με περιεκτικότητα 1 έως 4 g αιωρούμενων στερεών. Για κάθε μονάδα αερισμού απαιτούνται κατά προσέγγιση 150 ml ανάμεικτου υγρού.

Παρασκευάζονται μητρικά διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας σε απεσταγμένο νερό· απαιτείται συνήθως συγκέντρωση 400 mg/l σε οργανικό άνθρακα, που δίνει συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας 20 mg/l σε οργανικό άνθρακα στην αρχή κάθε κύκλου αερισμού, εφόσον δεν σημειώνεται καθόλου βιοαποικοδόμηση.

Επιτρέπονται και υψηλότερες συγκεντρώσεις, εφόσον το επιτρέπει η τοξικότητα απέναντι στους μικροοργανισμούς. Μετράται η περιεκτικότητα των μητρικών διαλυμάτων σε οργανικό άνθρακα.

1.6.2. *Συνθήκες της δοκιμής*

Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται στους 20 έως 25 °C.

Χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση αεροβίων μικροοργανισμών (από 1 έως 4 g/l αιωρούμενων στερεών υλών) και ο πραγματικός χρόνος κατακράτησης είναι 36 ώρες. Το ανθρακούχο υλικό στα λύματα τροφοδότησης οξειδώνεται εξαντλητικά, σύνήθως μέσα σε οκτώ ώρες μετά την έναρξη κάθε κύκλου αερισμού. Στη συνέχεια, η ιλύς αναπνέει ενδογενώς για το υπόλοιπο της περιόδου αερισμού, διάστημα κατά το οποίο το μόνο διαθέσιμο υπόστρωμα είναι η ελεγχόμενη ένωση, εκτός εάν και αυτή μεταβολίζεται εύκολα. Τα χαρακτηριστικά αυτά, σε συνδυασμό με τον καθημερινό επανεμβολιασμό του ελέγχου με εμβόλιο από αστικά λύματα, παρέχουν εξαιρετικά ευνοϊκές συνθήκες τόσο για εγκλιματισμό όσο και για μεγάλους βαθμούς βιοαποικοδόμησης.

1.6.3. *Εκτέλεση της δοκιμασίας*

Λαμβάνεται δείγμα ανάμεικτου υγρού από κατάλληλη εγκατάσταση ενεργοποιημένης ιλύος επεξεργασίας αστικών κυρίως λυμάτων ή εργαστηριακή μονάδα και διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. Σε κάθε μονάδα αερισμού καθώς και στη μονάδα μάρτυρα μεταφέρονται 150 ml (όταν χρησιμοποιείται η πρωτότυπη μονάδα ελέγχου SCAS, να πολλαπλασιάζονται οι αναφερόμενοι όγκοι επί 10) ανάμεικτου υγρού και αρχίζει ο αερισμός. Μετά από 23 ώρες ο αερισμός σταματά και η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει για 45 λεπτά. Ανοίγεται η στρόφιγγα κάθε δοχείου με τη σειρά και αφαιρούνται ποσότητες 100 ml από το υπερκείμενο υγρό. Λαμβάνεται δείγμα διαυγασμένων αστικών λυμάτων αμέσως πριν από τη χρήση και 100 ml από αυτό προστίθενται στην ιλύ που έχει απομείνει σε κάθε μονάδα αερισμού. Αρχίζει πάλι ο αερισμός. Στο στάδιο αυτό δεν προστίθενται ελεγχόμενα υλικά και οι μονάδες τροφοδοτούνται καθημερινά μόνο με αστικά λύματα, μέχρι να ληφθεί καθαρό υπερκείμενο υγρό μετά την καθίζηση. Η διαδικασία αυτή απαιτεί συνήθως δύο εβδομάδες, στο τέλος των οποίων ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας που περιέχεται στο υπερκείμενο υγρό στο τέλος κάθε κύκλου αερισμού πλησιάζει μια σταθερή τιμή.

Στο τέλος της περιόδου αυτής αναμειγνύονται οι επιμέρους διαυγασμένες ιλύες και σε κάθε μονάδα προστίθενται 50 ml της προκύπτουσας σύνθετης ιλύος.

Στις μονάδες μάρτυρες προστίθενται 100 ml διαυγασμένων λυμάτων, ενώ στις μονάδες ελέγχου 95 ml συν 5 ml από το κατάλληλο μητρικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας (400 mg/l). Αρχίζει πάλι ο αερισμός, που συνεχίζεται για 23 ώρες. Η ιλύς αφήνεται κατόπιν να καθιζάνει για 45 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και αναλύεται για την περιεκτικότητά του σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα.

Η παραπάνω διαδικασία πλήρωσης και αφαίρεσης επαναλαμβάνεται καθημερινά σε όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας.

Πριν από την καθίζηση είναι πιθανόν να χρειαστεί καθαρισμός των τοιχωμάτων των μονάδων, ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση στερεών υλών πάνω από τη στάθμη του υγρού. Για κάθε μονάδα χρησιμοποιείται διαφορετικό ξέστρο ή ψήκτρα, ώστε να αποφευχθεί η αλληλομόλυνση.

Θεωρητικά, ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας στα υπερκείμενα υγρά προσδιορίζεται καθημερινά, παρόλο που επιτρέπονται και λιγότερο συχνές αναλύσεις. Πριν από την ανάλυση, τα υγρά διηθούνται μέσω διηθητικών μεμβρανών των 0,45 μm, που έχουν υποστεί έκπλυση ή φυγοκεντρούνται. Οι διηθητικές μεμβράνες είναι κατάλληλες, εφόσον εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διήθησης. Η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C, όταν αυτό βρίσκεται στη φυγόκεντρο.

Η διάρκεια της δοκιμασίας για ουσίες που παρουσιάζουν μικρή ή δεν παρουσιάζουν καθόλου βιοαποικοδόμηση είναι απροσδιόριστη, αλλά από την πείρα προκύπτει ότι θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 12 εβδομάδες κατά κανόνα, όχι όμως μεγαλύτερη από 26 εβδομάδες.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Χαράσσεται καμπύλη των τιμών του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στα υπερκείμενα υγρά των μονάδων ελέγχου και των μονάδων μαρτύρων συναρτήσει του χρόνου.

Όταν ολοκληρώνεται η βιοαποκοδόμηση, τα επίπεδα που βρίσκονται στη μονάδα ελέγχου τείνουν να πλησιάσουν τα επίπεδα του μάρτυρα. Μόλις διαπιστωθεί ότι η διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων είναι σταθερή επί τρεις διαδοχικές μετρήσεις, εκτελούνται τόσες περαιτέρω μετρήσεις όσες αρκούν για να επιτρέψουν τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και υπολογίζεται η επί τοις εκατό βιοαποικοδόμηση της ελεγχόμενης ένωσης (D_{da} ή D_{ssd}, βλέπε σημείο 1.2).

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση των αποτελεσμάτων της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει:

— κάθε πληροφορία για το είδος των λυμάτων, τον τύπο της μονάδας που χρησιμοποιήθηκε και τα πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία, την ουσία αναφοράς, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και τον τυφλό προσδιορισμό,

— τη θερμοκρασία,

— την καμπύλη απομάκρυνσης με περιγραφή, του τρόπο υπολογισμού (βλέπε σημείο 1.2),

— την ημερομηνία και την τοποθεσία της δειγματοληψίας για την ενεργοποιημένη ιλύ και τα λύματα, την κατάσταση προσαρμογής, τη συγκέντρωση κλπ.,

— τους επιστημονικούς λόγους για τυχόν αλλαγές στην πειραματική διαδικασία,

— υπογραφή και ημερομηνία.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Δεδομένου ότι η ουσία που πρόκειται να ελεγχθεί με τη μέθοδο αυτή δεν μπορεί εύκολα να βιοαποικοδομηθεί, οποιαδήποτε απομάκρυνση DOC οφειλόμενη αποκλειστικά σε βιοαποικοδόμηση θα είναι κανονικά σταδιακή σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων, εκτός από τις περιπτώσεις κατά τις οποίες εκδηλώνεται αιφνίδιος εγκλιματισμός, πράγμα που φαίνεται από μια ραγδαία εξαφάνιση μετά από μερικές εβδομάδες.

Η φυσικοχημική ωστόσο προσρόφηση μπορεί μερικές φορές να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο· αυτό φαίνεται με την πλήρη ή μερική απομάκρυνση του DOC που έχει προστεθεί στην αρχή. Το τι θα συμβεί κατόπιν εξαρτάται από παράγοντες όπως οι βαθμοί προσρόφησης και η συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στα απόβλητα που αποχύνονται. Συνήθως, η διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων DOC στα υπερκείμενα υγρά του μάρτυρα και της μονάδας ελέγχου αυξάνεται σταδιακά από την αρχικά χαμηλή τιμή και η διαφορά αυτή παραμένει κατόπιν στα νέα επίπεδα για το υπόλοιπο μέρος του πειράματος, εκτός αν συμβεί εγκλιματισμός.

Για να γίνει διάκριση ανάμεσα στη βιοαποικοδόμηση (ή τη μερική βιοαποικοδόμηση) και την προσρόφηση απαιτούνται περισσότερα πειράματα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, ο πειστικότερος όμως είναι να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο υγρό ή η ιλύς ως ενοφθάλμισμα σε μια δοκιμασία βασικής σειράς (base-set test) (κατά προτίμηση δοκιμασία αναπνοομετρίας).

Οι ελεγχόμενες ουσίες που παρουσιάζουν μεγάλη, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση του DOC στη δοκιμασία αυτή, θα πρέπει να θεωρούνται ως ισχυρά βιοαποικοδομήσιμες. Η μερική, μη οφειλόμενη σε προσρόφηση απομάκρυνση δείχνει ότι η χημική ένωση επιδέχεται βιοαποικοδόμηση τουλάχιστον ώς ένα βαθμό.

Η χαμηλή ή μηδενική απομάκρυνση DOC μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των μικροοργανισμών από την ελεγχόμενη ουσία, και αυτό μπορεί επίσης να φανεί με τη λύση και την απώλεια ιλύος, που οδηγεί σε θολά υπερκείμενα υγρά. Η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί με χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας.

Η χρήση μιας ειδικής αναλυτικής μεθόδου ή σημασμένης ελεγχόμενης ουσίας με ισότοπο ^{14}C μπορεί να επιτρέψει μεγαλύτερη ευαισθησία. Στην περίπτωση ελεγχόμενης ουσίας με ^{14}C, η ανάκτηση του $^{14}CO_2$ επιβεβαιώνει ότι έχει σημειωθεί βιοαποικοδόμηση.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε αρχική βιοαποικοδόμηση, θα πρέπει, αν είναι δυνατόν, να επεξηγείται η αλλαγή στη χημική σύνταξη, που οδηγεί σε απώλεια της απόκρισης της μητρικής ελεγχόμενης ουσίας.

Η εγκυρότητα της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να αναφέρεται μαζί με την απόκρισή της κατά τον προσποριομό της στον τυφλό έλεγχο.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι, 1982, *Test Guideline 302 A*, απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 τελικό.

Προσάρτημα 1

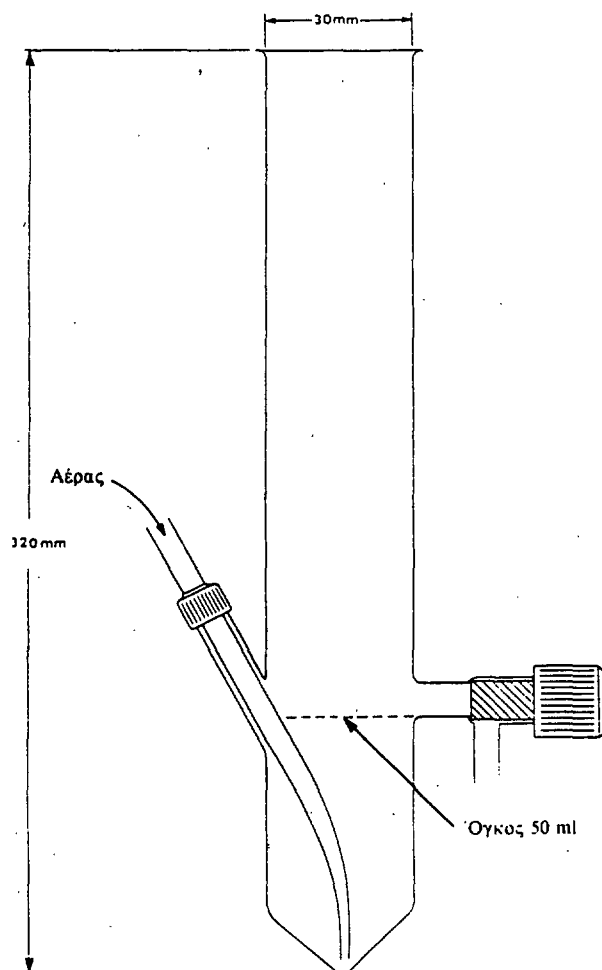
Δοκιμασία SCAS: παράδειγμα αποτελεσμάτων

Ουσία	C_T (mg/l)	$C_T - C_t$ (mg/l)	Εκατοστιαίο ποσοστό βιοαποικοδόμησης D_{da}	Διάρκεια δοκιμασίας (ημέρες)
Θειικό άλας του 4-ακετυλο-αμινοβενζολίου	17,2	2,0	85	40
Θειικό άλας του τετρα-προπυλενο-βενζολίου	17,3	8,4	51,4	40
4-Νιτροφαινόλη	16,9	0,8	95,3	40
Διαιθυλενογλυκόλη	16,5	0,2	98,8	40
Ανιλίνη	16,9	1,7	95,9	40
Τετρα-καρβοξυλικό άλας του κυκλοπεντανίου	17,9	3,2	81,1	120

Προσάρτημα 2

Παράδειγμα συσκευής δοκιμασίας

Σχήμα 1



Εγκρίνουμε την παραπάνω απόφαση του Ανωτάτου Χημικού Συμβουλίου καθώς και τη δημοσίευσή της στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως και ορίζουμε ότι θα αρχίσει η ισχύς της από την ημέρα που θα δημοσιευθεί.

Αθήνα, 30 Σεπτεμβρίου 1988

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ

ΥΦ/ΓΟΣ ΕΘΝΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ
ΓΙΑΝΝΟΣ ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΣΟΒΟΛΑΣ

ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ